



**UNICAMP**

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

**POLIANA DEYSE GURAK**

**DEGRADAÇÃO TÉRMICA E QUÍMICA DE  $\beta$ -CAROTENO E  
SUA RELAÇÃO COM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E  
PROPRIEDADES DE COR**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS.

**ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE**

Orientadora

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Poliana Deyse Gurak, aprovada pela comissão julgadora em 07/12/2011 e orientada pela Profa. 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

G96d Gurak, Poliana Deyse  
Degradação térmica e química de  $\beta$ -caroteno e sua  
relação com a capacidade antioxidante e propriedades de  
cor / Poliana Deyse Gurak. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

1. Carotenóides. 2. Tratamento térmico. 3.  
Reações de oxidação. 4. Parâmetros CIELAB. 5.  
Isomerização. I. Mercadante, Adriana Zerlotti II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Thermal and chemical degradation of  $\beta$ -carotene and its  
relation with antioxidant capacity and the colour properties

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Carotenoids

Heat treatment

Oxidation reactions

CIELAB parameters

Isomerization

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Adélia Ferreira de Faria Machado

Lilian Regina Barros Mariutti

Veridiana Vera de Rosso

Neura Bragagnolo

Data da defesa:07/12/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Poliana Deyse Gurak, aprovada pela comissão julgadora em 07 de dezembro de 2011.

---

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Orientadora)  
UNICAMP

---

Dra. Adélia Ferreira de Faria Machado  
EMBRAPA

---

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti  
UNICAMP

---

Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso  
UNIFESP

---

Profa. Dra. Neura Bragagnolo  
UNICAMP

---

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos  
UNESP

---

Profa. Dra. Leila Queiroz Zepka  
UFSM

---

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado  
UNICAMP



Dedico essa vitória à minha família e meus queridos amigos de todas as horas.



## AGRADECIMENTOS

Aos órgãos e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do doutorado e infra-estrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida e financiamento concedido ao projeto.

À *Universidad de Sevilla*, em especial ao grupo de pesquisa de *Color y Calidad de Alimentos* pela oportunidade de trabalhar por dois meses em sua equipe.

À todos que de forma direta ou indiretamente incentivaram e que tornaram possível a conclusão deste trabalho:

À professora Dra. Adriana Zerlotti Mercadante pela oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos e atenção dada a mim e a este trabalho.

Ao Dr. Antônio Jesus Meléndez-Martínez pela orientação, incentivo e carinho.

Ao Dr. Cláudio Borsarrelí pela colaboração.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições, sugestões e atenção apresentadas na redação final deste trabalho.

Aos professores da Unicamp pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas cursadas.

Aos funcionários da Unicamp pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À Adélia Ferreira de Faria Machado pelos ensinamentos práticos e teóricos sobre carotenóides e paciência dedicada a mim.

Ao Eliseu Rodrigues pelo constante apoio.

Ao Renan Campos Chisté pela amizade, carinho e por ser meu fiel companheiro desde o início do doutorado.

À Walkíria Cristina Vilela Ribeiro pela incansável ajuda e amizade.

À Ádria Sousa Bentes, Aline Medina, Ana Augusta Odorissi Xavier, Bruno Chacon Figueiredo, Elaine Berger, Elisângela Serenato Madalozzo, Fabíola Lima, Fernanda Mandelli, Gislaine Crystina Nogueira Faria, Leila Zepka Queiroz, Lilian Regina Barros

Mariutti, Lizziane Vissotto, Jéssica Grigoletto, Hugo de Souza, Maria Ivone Martins Jacinto Barbosa, Marcella Marques, Mery Yovana, Michelli Crisgon, Milena Bagetti, Nathália Azevedo, Naira Poerner, Renata Sancho, Rosemar Santana e Viviane Miranda pelo companherismo e pela ótima convivência dentro e fora do laboratório.

Àos meus amigos de perto, de longe e novas amizades que surgiram durante o doutorado, especialmente à Ana Elizabeth Fai, Aline Fedel, Daniela Cristina Fabrin, Flávia Silva Monteiro, Luciana Figueiredo, Isabella Martins, Maria José Jarra, Maria Lúcia de Oliveira, Pollyanne Port's, Patrícia Sampaio, Roberta de Oliveira, Suzane Alencar e Vivian Bochi com que dividi momentos acadêmicos e não acadêmicos durante esses anos de doutorado.

À Dirse O. Gurak, Geroncio Gurak (*in memorian*), Gerusa Silécia Gurak, Miguel Geroncio Gurak, Leandro Freitas, Paula Ritter, Polônia da Silva e todos meus queridos familiares que sempre acompanharam minha trajetória acadêmica. Sublinho minha gratidão por terem acreditado em meus sonhos, sustentado minhas decisões e, por muitas vezes, subsidiado minhas escolhas.

Muito obrigada!



“Sé que hay en tus ojos con solo mirar  
que estas cansado de andar y de andar  
y caminar girando siempre en un lugar  
Sé que las ventanas se pueden abrir  
cambiar el aire depende de ti  
te ayudara vale la pena una vez más  
Saber que se puede querer que se pueda  
quitarse los miedos sacarlos afuera  
pintarse la cara color esperanza  
tentar al futuro con el corazón  
Es mejor perderse que nunca embarcar  
mejor tentarse a dejar de intentar  
aunque ya ves que no es tan fácil empezar  
Sé que lo imposible se puede lograr  
que la tristeza algún día se irá  
y así será la vida cambia y cambiará  
Sentirás que el alma vuela  
por cantar una vez más...  
Vale más poder brillar  
Que solo buscar ver el sol”

**Color esperanza - Diego Torres**

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Histórico de carotenóides.....	4
3.2 Degradação térmica de carotenóides.....	5
3.2.1 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno .....	7
3.3 Degradação química de carotenóides.....	11
3.3.1 Degradação química de $\beta$ -caroteno .....	13
3.4 Cor.....	14
3.4.1 Efeito da degradação de carotenóides na cor .....	15
3.5 Capacidade antioxidante de carotenóides .....	17
3.5.1 Método de desativação do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	18
3.5.2 Método de desativação do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) .....	19
3.5.3 Capacidade antioxidante/pró-oxidante de $\beta$ -caroteno e de seus produtos de degradação.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Padrões .....	24
4.2 Cristalização de $\beta$ -caroteno .....	24

4.3 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno sólido em sistemas-modelo .....	24
4.4 Degradação química do $\beta$ -caroteno: reação induzida com permanganato de potássio (KMnO <sub>4</sub> ).....	27
4.5 Degradação química do $\beta$ -caroteno: reação induzida com ácido meta-cloro-perbenzóico (MCPBA) .....	28
4.6 Determinação de carotenóides totais .....	29
4.7 Identificação dos compostos de degradação por HPLC-DAD-MS/MS.....	30
4.8 Quantificação por HPLC-DAD dos carotenóides formados nos sistemas-modelo submetidos ao aquecimento .....	31
4.9 Quantificação por HPLC-DAD dos carotenóides dos sistemas submetidos à reação química com KMnO <sub>4</sub> e MCPBA.....	32
4.10 Método de desativação do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	33
4.11 Método de desativação do oxigênio singlete ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ) .....	34
4.12 Determinação dos parâmetros de cor .....	35
4.13 Análise dos dados.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
5.1 Cristalização de $\beta$ -caroteno .....	37
5.2 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno.....	39
5.2.1 Identificação dos carotenóides formados durante degradação térmica .....	39
5.2.2. Influência do aquecimento no conteúdo de carotenóides totais .....	47
5.2.3 Perfil de degradação térmica de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e de formação de isômeros <i>cis</i> , epóxidos e apocarotenóides .....	53

5.2.4 Efeito da degradação térmica de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno na cor da solução .....	61
5.2.5 Influência do aquecimento na capacidade antioxidante .....	66
5.3 Degradação química do $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA .....	73
5.3.1 Identificação dos principais compostos formados na reação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA .....	73
5.3.2 Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno induzida por reações químicas e formação de compostos de degradação.....	80
5.3.3 Mudanças no espectro UV-visível ocorridas durante as reações químicas do $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA .....	86
5.3.4 Modificações de cor ocorridas durante a degradação química de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ .....	87
5.3.5 Modificações de cor durante a degradação química de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno com MCPBA.....	91
5.3.6 Atividade antioxidante dos compostos formados durante a degradação química com $\text{KMnO}_4$ .....	95
6 CONCLUSÕES.....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
8 APÊNDICE .....	111
8.1 Apêndice 1.....	112
8.2 Apêndice 2.....	118
8.3 Apêndice 3.....	122
8.4 Apêndice 4.....	123

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais mudanças estruturais que ocorrem durante aquecimento de carotenóides. Adaptado de Borsarelli & Mercadante (2010). .....	6
Figura 2. Seqüência de reações para a formação de epóxidos de $\beta$ -caroteno durante o aquecimento. 1) <i>all-trans</i> - $\beta$ -caroteno; 2) 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno; 3) 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno; 4) 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno; 5) 5,8:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno; 6) 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno. Fonte: Marty & Berset (1986).....	8
Figura 3. Mecanismo de epoxidação de $\beta$ -caroteno com MCPBA. Fonte: modificado de Ambros & Schuch (1997) e Burke & Danheiser (1999). .....	11
Figura 4. Mecanismo da clivagem oxidativa das ligações duplas carbono-carbono por meio de $\text{KMnO}_4$ para formação de apocarotenóides. Fonte: modificado de Fatiadi (1987). .....	12
Figura 5. Coordenadas do sistema espacial CIELAB.....	15
Figura 6. Formação e desativação do cátion radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ . Fonte: Huang, Ou & Prior (2005). .....	18
Figura 7. Procedimento simplificado utilizado para avaliar a degradação térmica de $\beta$ -caroteno sólido. ....	26
Figura 8. Procedimento simplificado utilizado para a reação química induzida com $\text{KMnO}_4$ . .....	28
Figura 9. Procedimento simplificado utilizado para a reação química induzida com MCPBA.....	29
Figura 10. Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico <i>cis</i> . Adaptado de Mercadante (2008).....	31
Figura 11. Cromatogramas, processados a 450 nm, obtidos por HPLC-DAD, do padrão sintético de $\beta$ -caroteno sem purificar (a) e após duas cristalizações (b). As condições cromatográficas estão descritas no item 4.2 do material e métodos. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 2. ....	37
Figura 12. Microscopia óptica de $\beta$ -caroteno, cristalizado 2 vezes. Lentes objetivas de	

12,5 (esquerda) e 25 x (direita), ambas com optular de 1,25 x. Barras: 100 $\mu\text{m}$ . .....	38
Figura 13. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 5, 7 e 10 minutos do $\beta$ -caroteno aquecido a 150 $^{\circ}\text{C}$ em presença de ar. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7 do material e métodos. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 3. ....	40
Figura 14. Degradação de carotenóides totais a 120 $^{\circ}\text{C}$ , na presença de ar com e sem galato de propila e sob fluxo de oxigênio. ....	48
Figura 15. Espectros UV-visível do all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno submetido ao aquecimento a 120 $^{\circ}\text{C}$ , em presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e presença de ar com galato de propila (c). ....	49
Figura 16. Estrutura química do galato de propila. ....	50
Figura 17. Degradação de carotenóides totais a 150 $^{\circ}\text{C}$ , em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio. ....	51
Figura 18. Espectros UV-visível de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno submetido ao aquecimento a 150 $^{\circ}\text{C}$ , em presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e de nitrogênio (c). ....	52
Figura 19. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 120 $^{\circ}\text{C}$ em presença de ar. ....	54
Figura 20. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 120 $^{\circ}\text{C}$ em presença de ar e galato de propila. ....	55
Figura 21. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 120 $^{\circ}\text{C}$ com fluxo de oxigênio. ....	56
Figura 22. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 150 $^{\circ}\text{C}$ na presença de ar. ....	57
Figura 23. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e de formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 150 $^{\circ}\text{C}$ com fluxo de oxigênio. ....	58
Figura 24. Degradação de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e formação de isômeros <i>cis</i> e produtos de oxidação a 150 $^{\circ}\text{C}$ com fluxo de nitrogênio. ....	59
Figura 25. Mecanismo proposto para a formação de produtos da degradação de $\beta$ -caroteno sólido aquecido a 120 e 150 $^{\circ}\text{C}$ com presença de ar, ar com galato de propila,	

fluxo de oxigênio e fluxo de nitrogênio.....	60
Figura 26. Capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) do sistema de $\beta$ -caroteno aquecido a 120 °C na presença de ar (a) e com fluxo de oxigênio (b).....	66
Figura 27. Capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) do sistema de $\beta$ -caroteno aquecido a 150 °C na presença de ar (a), com fluxo oxigênio (b) e de nitrogênio (c).....	68
Figura 28. Efeito protetor contra oxigênio singlete do sistema de $\beta$ -caroteno submetido a diferentes tempos de aquecimento a 120 °C em presença de ar (a), ar com galato de propila (b) e fluxo de oxigênio (c).....	70
Figura 29. Efeito protetor contra oxigênio singlete do sistema de $\beta$ -caroteno submetido a diferentes tempos de aquecimento a 150 °C na presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e de nitrogênio (c).....	72
Figura 30. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos da reação de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ . As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 7.....	74
Figura 31. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos da reação de $\beta$ -caroteno com MCPBA. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7. A identidade dos picos encontra-se na Tabela. 8.....	76
Figura 32. Distribuição, em porcentagem (%), de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e dos compostos formados ao longo da reação química com $\text{KMnO}_4$ .....	81
Figura 33. Distribuição, em porcentagem, de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e dos compostos formados ao longo da reação química com MCPBA.....	83
Figura 34. Seqüência de formação de produtos da degradação de $\beta$ -caroteno via reações químicas induzidas por $\text{KMnO}_4$ e MCPBA.....	84
Figura 35. Porcentagem de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e de compostos de degradação durante reação química com $\text{KMnO}_4$ (a) e MCPBA (b). ....	85
Figura 36. Espectros UV-visível monitorados durante degradação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ . ....	86

Figura 37. Espectros UV-visível monitorados durante degradação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA. ....	87
Figura 38. Espectros de reflectância obtidos durante a reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ , no tempo 0 a 60 min (a) e 0, 60 a 600 min (b). ....	88
Figura 39. Parâmetro croma ( $C^*_{ab}$ ) medido em diferentes diluições realizadas durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ (FD = fator de diluição).....	91
Figura 40. Espectros de reflectância obtidos durante reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA, de 0 a 60 min (a) e 0, 60 a 480 min (b).....	92
Figura 41. Parâmetro croma ( $C^*_{ab}$ ) obtido com diferentes diluições realizadas durante reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA (FD = fator de diluição). ....	94
Figura 42. Capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) e concentração de carotenóides totais determinada por HPLC-DAD da mistura de $\beta$ -caroteno e dos produtos de degradação formados em cinco tempos de reação química com $\text{KMnO}_4$ .....	95
Figura 43. Comportamento da coordenada de cor $b^*$ e do croma ( $C^*_{ab}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a 120 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila. ....	118
Figura 44. Comportamento da coordenada de cor $b^*$ e do croma ( $C^*_{ab}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio.....	118
Figura 45. Diferença global da cor durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a 120 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila. ....	119
Figura 46. Diferença global da cor durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio. ....	119



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas na degradação térmica de $\beta$ -caroteno. ....	25
Tabela 2. Características cromatográficas e espectrofotométricas, e composição relativa (%), obtidas por HPLC-DAD, dos compostos presentes no padrão sintético de $\beta$ -caroteno sem purificar, cristalizado e recristalizado.....	38
Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados nos sistemas-modelo de $\beta$ -caroteno submetidos ao aquecimento a 120 e 150 °C.....	41
Tabela 4. Compostos detectados durante a degradação de $\beta$ -caroteno sólido aquecido a 120 e 150 °C em presença de ar com e sem galato de propila, fluxo de oxigênio ou de nitrogênio.....	42
Tabela 5. Parâmetros de cor durante aquecimento a 120 °C do $\beta$ -caroteno na presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila.....	62
Tabela 6. Parâmetros de cor durante o aquecimento a 150 °C de $\beta$ -caroteno na presença de ar, sob fluxo de oxigênio e fluxo de nitrogênio. ....	64
Tabela 7. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados durante a reação química do $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ .....	75
Tabela 8. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados durante a reação química do $\beta$ -caroteno com MCPBA. ....	77
Tabela 9. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrorradiômetro durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ . ....	89
Tabela 10. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro seguido de cálculo no software Cromalab® durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ , tempos entre 0 a 60 min. ....	90
Tabela 11. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro seguido de cálculo no software Cromalab® durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ , tempos 0 seguido dos tempos de 60 a 600 min. ....	90
Tabela 12. Parâmetros de cor obtidos em espectrorradiômetro durante reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA. ....	92

Tabela 13. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro, seguido de cálculos no software CromaLab®, durante reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA...	93
Tabela 14. $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) da mistura de $\beta$ -caroteno e dos produtos de oxidação formados em cinco tempos da reação química com $\text{KMnO}_4$ .....	97
Tabela 15. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ em presença de ar.....	112
Tabela 16. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ com sob fluxo de oxigênio. ....	113
Tabela 17. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ em presença de ar com galato de propila. ....	114
Tabela 18. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ em presença de ar.....	115
Tabela 19. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fluxo de oxigênio. ....	116
Tabela 20. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de $\beta$ -caroteno a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fluxo de nitrogênio. ....	117
Tabela 21. Análise de regressão, com nível de significância de 95 %, entre a concentração de all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno, carotenóides totais medidos por HPLC-DAD e carotenóides totais medidos em espectrofotômetro-DAD com os parâmetros de cor durante aquecimento de $\beta$ -caroteno sob diferentes condições. ....	120
Tabela 22. Valores de $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*_{ab}$ e $h_{ab}$ com diferentes diluições realizadas durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ ,.....	122
Tabela 23. Valores de $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*_{ab}$ e $h_{ab}$ com diferentes diluições realizadas durante reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA. ....	123
Tabela 24. Análise de regressão, com nível de significância de 95 %, entre as absorvâncias a 330, 400, 425 e 450 nm e parâmetros de cor durante reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA. ....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$a^*$ : parâmetro colorimétrico do eixo de cores vermelho (+) ao verde (-)

AAPH: 2,2-azobis-dicloridrato amidinopropano

Abs: Absorbância

ABTS<sup>•+</sup>: radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

APCI: ionização química a pressão atmosférica

$b^*$ : parâmetro colorimétrico do eixo de cores amarelo (+) ao azul (-)

BHA: butil-hidroxi-anisol

BHT: butil-hidroxi-tolueno

$C^*_{ab}$ : croma ou saturação de cor

CAR: carotenóide

<sup>3</sup>CAR: carotenóide no estado triplete excitado

<sup>1</sup>CAR: carotenóide no estado singlete excitado

CHCl<sub>3</sub>: clorofórmio

CIE: Comissão Internacional de Iluminação

CIELAB: sistema espacial colorimétrico  $L^* a^* b^*$

$\Delta E^*$ : diferença global de cor

D<sub>65</sub>: ângulo do observador

DAD: detector de arranjo de fotodiodos

DMA: 9,10-dimetil-antraceno

DNA: ácido desoxirribonucléico

$E_a$ : energia de ativação

FD: fator de diluição

$h_{ab}$ : ângulo hue, indica a tonalidade

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

KMnO<sub>4</sub>: permanganato de potássio

$k_{obs}$ : constante de velocidade

$k_q$ : constante de desativação física

$k_r$ : constante de desativação química

$K_{ics}$ : constante de inter cruzamento de sistemas

$K_{et}$ : constante de transferência de energia

$L^*$ : coordenada de cor que indica a luminosidade

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

LPM: litros por minuto

$k_{obs}^{DMA}$  : constante de velocidade de degradação do 9,10-dimetil-antraceno

$k_{obs}^{DMA+CAR}$  : constante de velocidade de degradação do 9,10-dimetil-antraceno na presença de carotenóides

$m/z$ : massa/carga

MB: azul de metileno

MCPBA: ácido meta-cloro-perbenzóico

MeOH: metanol

MS: espectrometria de massas

$[M + H]^+$ : molécula protonada

MTBE: éter metil *tert*-butílico

NaHCO<sub>3</sub>: tiosulfato de sódio

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de sódio anidro

NB<sub>4</sub>: linhagem de célula de leucemina promielocítica

nd: não detectado

ni 1: pico não identificado número 1

ni 2: pico não identificado número 2

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio molecular no estado singlete

<sup>3</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio molecular no estado triplete

S: sensibilizador

<sup>1</sup>S\*: sensibilizador no estado singlete excitado

<sup>3</sup>S\*: sensibilizador no estado triplete excitado

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação da regressão

RMN: ressonância magnética nuclear

RNS: espécies reativas de nitrogênio

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPM: rotações por minuto

S: coeficiente angular da curva

s: coeficiente linear da curva

TBHQ: *tert*-butil-hidroquinona

TEA: trietilamina

TEAC: capacidade antioxidante equivalente em trolox

$\alpha$ TEAC: capacidade antioxidante em equivalente de  $\alpha$ -tocoferol

$t_r$ : tempo de retenção

UA: unidade de absorbância

UV-vis: ultravioleta visível

%  $A_B/A_{II}$ : intensidade do pico *cis*

% III/II: estrutura fina espectral

$\lambda_{max}$ : comprimento de onda de absorção máxima

## RESUMO

Muitos processos utilizados na indústria de alimentos empregam altas temperaturas e proporcionam o contato dos alimentos com substâncias pró-oxidantes. Tais condições tornam a sequência de ligações duplas conjugadas presente nos carotenoides susceptível à isomerização geométrica, oxidação e degradação. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a degradação térmica e química do  $\beta$ -caroteno, através da identificação dos compostos primários de degradação e sua relação com a capacidade antioxidante e as propriedades de cor. Os experimentos realizados foram: a) aquecimento a 120 °C na presença de ar; b) aquecimento a 120 °C sob fluxo de oxigênio, c) aquecimento a 120 °C na presença de ar e adição de galato de propila; d) aquecimento a 150 °C na presença de ar; e) aquecimento a 150 °C sob fluxo de oxigênio; f) aquecimento a 150 °C sob fluxo de nitrogênio; g) clivagem oxidativa com permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e h) reação de epoxidação com ácido meta-cloro-perbenzóico (MCPBA). A degradação do  $\beta$ -caroteno foi monitorada através da análise de carotenóides totais por espectrofotometria, a avaliação da cor por colorimetria (parâmetros CIELAB) e análise do perfil de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de fotodiodos e espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS). As alterações na capacidade antioxidante foram avaliadas por meio da capacidade de desativação do radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e da proteção contra o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) utilizando o 9,10-dimetil-antraceno como actinômetro e azul de metileno como sensibilizador. Foram identificados 16 carotenóides gerados pela degradação térmica e química do  $\beta$ -caroteno. O aquecimento resultou na diminuição da concentração de *all-trans*- $\beta$ -caroteno com a formação de isômeros (13-*cis*, 9-*cis*, 15-*cis*, 9,13-di-*cis*, 9,15-di-*cis*, 9,13'-di-*cis*, 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno), epóxidos (5,6 e 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno) e, em menor quantidade, apocarotenóides ( $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal). Na oxidação química com  $\text{KMnO}_4$ , o *all-trans*- $\beta$ -caroteno foi totalmente degradado após 30 min de reação com formação de  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-15-carotenal e semi- $\beta$ -carotenona. Já na reação com MCPBA, o *all-trans*- $\beta$ -caroteno não foi completamente degradado e os produtos de degradação formados em maior proporção foram 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno e 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, além de pequena quantidade de 13-*cis*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Em todos os experimentos

foi observada a existência de correlação superiores a 0,91 entre alguns parâmetros físicos de cor ( $b^*$  e  $C^*_{ab}$ ) e o parâmetro químico (teor de carotenóides totais), indicando que estes parâmetros de cor podem ser utilizados para monitorar a degradação de carotenóides. O mecanismo proposto para os dois tipos de degradação (térmica e química) envolveu reações reversíveis e irreversíveis, para formação de compostos de isomerização e de oxidação, respectivamente. A análise da capacidade antioxidante mostrou que a presença isolada de  $\beta$ -caroteno ou a mistura de  $\beta$ -caroteno com produtos de degradação térmica apresentaram valores similares de TEAC (capacidade antioxidante equivalente a trolox) e de porcentagem de proteção contra  $^1O_2$ . Por outro lado, os produtos de oxidação gerados na reação química com  $KMnO_4$  resultaram em um aumento nos valores de TEAC e maior eficiência da desativação do  $^1O_2$  com o aumento do tempo de reação.

**Palavras-chave:** carotenóides, tratamento térmico, reações de oxidação, parâmetros CIELAB, isomerização.

## SUMMARY

Many processes in the food industry apply high temperatures and allow the contact with pro-oxidant substances, such conditions in which the sequence of conjugated double bonds, present in carotenoids, is susceptible to geometric isomerization, oxidation and degradation. Therefore, the main aim of this work was to study the thermal and chemical degradation of  $\beta$ -carotene, identifying the primary degradation compounds and its relation with the antioxidant capacity and colour properties. The experiments were: a) heating at 120 °C with air exposure; b) heating at 120 °C under flow of pure oxygen; c) heating at 120 °C with air exposure and addition of propyl gallate; d) heating at 150 °C with air exposure; e) heating at 150 °C under flow of pure oxygen; f) heating at 150 °C under a flow of pure nitrogen; g) oxidative cleavage with potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ); and h) epoxidation with meta-chloroperbenzoic acid (MCPBA). In all experiments, the degradation and formation of isomerization and oxidation products were monitored by analysis of total carotenoids by spectrophotometer, colour evaluation by colorimetry and carotenoid profile analysis by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). Changes in the antioxidant capacity were monitored by the scavenging capacity against the ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), and protection against singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) using 9,10-dimethylanthracene as actinometer and methylene blue as sensitizer. A total of sixteen carotenoids were identified in both the chemical and thermal degradation of  $\beta$ -carotene. Heating caused a decrease in the all-*trans*- $\beta$ -carotene content with the formation of *cis* isomers (13-*cis*, 9-*cis*, 15-*cis*, 9,13-di-*cis*, 9,15-di-*cis*, 9,13'-di-*cis*, 13,15-di-*cis*- $\beta$ -carotene), epoxides (5,6 and 5,8-epoxy- $\beta$ -carotene) and apocarotenoids ( $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal). The chemical degradation with  $\text{KMnO}_4$  completely degraded the all-*trans*- $\beta$ -carotene in 30 minutes of reaction, with the formation of  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-15-carotenal and semi- $\beta$ -carotenone. In the reaction with MCPBA, all-*trans*- $\beta$ -carotene was not completely degraded and the major products were 5,6-epoxy- $\beta$ -carotene, 5,6:5',6'-diepoxy- $\beta$ -carotene, 5,6:5',8'-diepoxy- $\beta$ -carotene and 5,8-epoxy- $\beta$ -carotene, with small amounts of 13-*cis*- $\beta$ -carotene and 9-*cis*- $\beta$ -carotene. All experiments showed correlations above 0.91 between some physical colour parameters ( $b^*$  and  $C^*_{ab}$ ) and chemical parameters (content of total carotenoids), indicating that some colour parameters can be used to monitor



carotenoid degradation. The proposed mechanism in both types of degradation (thermal and chemical) involved reversible and irreversible reactions, to the formation of isomerization and oxidation compounds, respectively. The analysis of the antioxidant capacity showed that both pure  $\beta$ -carotene and the mixture of  $\beta$ -carotene with thermal degradation products had similar values of TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), as well as similar protection percentage against  $^1\text{O}_2$ . On the other hand, the products formed in the chemical reaction with  $\text{KMnO}_4$  resulted in increase in both the TEAC values and protection against  $^1\text{O}_2$  with the increase in reaction time.

**Keywords:** carotenoids, heating, oxidation reactions, CIELAB parameters, isomerization.

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis que apresentam uma coloração que varia do amarelo ao vermelho, podendo ser encontrados em vegetais, animais e microrganismos. Os carotenóides dos alimentos são normalmente tetraterpenóides de 40 carbonos, formados pela união de oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, caracterizando uma molécula linear com simetria invertida na posição central. Por apresentar em sua estrutura uma extensa cadeia de ligações duplas conjugadas, geram, por ressonância, um sistema de elétrons  $\pi$  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, o que caracteriza o cromóforo da molécula.

Estes compostos têm despertado grande interesse em diversas áreas devido a algumas de suas propriedades e funções, entre as quais destacam-se o poder corante, a capacidade antioxidante e a atividade de pró-vitamina A de alguns carotenóides. Ademais, entre os pigmentos naturais, os carotenóides são os mais utilizados na indústria de alimentos como aditivo corante, além de estarem presentes naturalmente na composição de muitos alimentos.

Isômeros, epóxidos e apocarotenóides são considerados os produtos primários da degradação de carotenóides, a partir dos quais são originados os compostos de baixo peso molecular (Marty & Berset, 1988; Caris-Veyrat et al., 2003; Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2007). A temperatura de aquecimento dos alimentos favorece as reações de isomerização e oxidação de carotenóides. Além disso, pesquisas têm relatado que alguns desses compostos oxidados parecem estar envolvidos na modulação de vias de sinalização intracelular (Palozza et al., 2009).

A formação desses compostos de degradação de carotenóides em alimentos depende principalmente do tipo e o estado físico dos carotenóides presentes, do oxigênio disponível, da presença de luz, calor, metal, ácidos, enzimas, peróxidos e pró-oxidantes. Entretanto, a presença de alguns antioxidantes, tais como vitaminas E e C, a severidade do tratamento (aumento da superfície de contato, tempo e a temperatura de aquecimento), a embalagem e as condições de estocagem podem inibir ou diminuir a velocidade de formação desses compostos (Henry et al., 2000; Aman; Schieber & Carle, 2005; Mercadante, 2008; Bechoff et al., 2010).

As principais conseqüências da degradação de carotenóides são a perda da cor e a diminuição ou perda da atividade de pró-vitamina A em produtos alimentícios

submetidos aos processos de cozimento, fritura, pasteurização, extrusão, desidratação e também refino de óleos vegetais, onde ocorrem reações de desacidificação, branqueamento e desodorização (Ahmed, Shivare & Sandhu, 2002; Dhuique-Mayer et al., 2007; Ferreira & Rodriguez-Amaya, 2008).

Neste contexto, a identificação dos compostos formados durante a degradação de carotenóides e a avaliação de seu poder corante e de sua capacidade antioxidante é de extrema importância para compreender as mudanças que ocorrem durante o processamento de diversos alimentos que possuem carotenóides, naturalmente presentes ou adicionados como corantes.

## 2 OBJETIVOS

Considerando que o sistema de ligações duplas conjugadas dos carotenóides é o responsável por conferir cor, apresentar atividade antioxidante e também pela baixa estabilidade da molécula quando exposta a altas temperaturas e ao contato com substâncias oxidativas, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação térmica e química do  $\beta$ -caroteno e seu efeito no poder corante e na capacidade antioxidante. Desta forma, os objetivos específicos foram:

- Identificar e quantificar por HPLC-DAD-MS/MS os produtos de degradação de  $\beta$ -caroteno formados durante o aquecimento em sistemas-modelo a 120 e 150 °C na presença de ar, com e sem galato de propila, assim como sob fluxo de oxigênio e de nitrogênio;
- Identificar e quantificar por HPLC-DAD-MS/MS os produtos formados durante a reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA e  $\text{KMnO}_4$ ;
- Avaliar os parâmetros de cor dos sistemas-modelo;
- Verificar a capacidade de desativação do  $\text{ABTS}^{++}$  e do  $^1\text{O}_2$  nos sistemas submetidos à degradação térmica e à degradação química por  $\text{KMnO}_4$ .

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Histórico de carotenóides

As primeiras publicações registradas que fazem referência aos carotenóides datam do início do século XIX, apresentando estudos que revelaram que estes compostos lipofílicos bastante lábeis, estavam presentes em pimentões maduros, folhas de outono e cenouras, de cujo nome científico, *Daucus carota*, derivou-se o termo “caroteno”. A instabilidade desses compostos fez com que sua investigação avançasse lentamente durante o restante do século XIX. Somente no início do século XX (1907), o pesquisador Willstätter determinou a fórmula molecular do “caroteno” ( $C_{40}H_{56}$ ) e da “xantofila” ( $C_{40}H_{58}O_2$ ). Um ano antes, o botânico Tswett descreveu a separação das clorofilas *a* e *b* e dos carotenóides em extrato de folhas verdes usando coluna de carbonato de cálcio (Gross, 1991; Eugster, 1995). A partir dessa investigação, com a separação de bandas de diferentes colorações, nasceu também a “cromatografia”.

A natureza altamente insaturada dos carotenóides foi descoberta em 1928 mediante hidrogenação catalítica, e alguns anos mais tarde foi comprovada a relação existente entre o número de ligações duplas conjugadas e a cor dos pigmentos. A estrutura correta dos grupos terminais do  $\beta$ -caroteno e de outros carotenóides foi identificada por Karrer e outros pesquisadores em 1930, época que também foi descoberta a correlação existente entre os carotenóides e a vitamina A, o que proporcionou o aumento no número de estudos com estes pigmentos (Gross, 1991; Eugster, 1995).

No ano de 1934, 11 carotenóides haviam sido caracterizados, em 1948 haviam 32 descritos, em 1971, 230 carotenóides e nos anos 90 já haviam sido descritos mais de 650 carotenóides (Eugster, 1995). Atualmente, o *Handbook of Carotenoids* (Britton, Liaaen-Jensen & Pfander, 2004) é considerado a referência mais completa dedicada à identificação desses compostos, apresentando mais de 700 carotenóides isolados, além de incluir estruturas químicas e apresentar informações relevantes para seu isolamento e características espectroscópicas úteis para auxiliar na identificação correta.

A produção sintética do  $\beta$ -caroteno foi iniciada pela Roche em 1954 e posteriormente pela BASF em 1960. Cada uma dessas empresas utilizava um método

diferente para sua produção, apesar de utilizarem o mesmo precursor, a  $\beta$ -ionona. Atualmente, o  $\beta$ -caroteno é responsável por cerca de 30 % do mercado de carotenóides que vem sendo dominado pelas empresas BASF, Merck, Rhône-Poulenc e DSM (Britton, Liaaen-Jensen & Pfander, 2004; Fraser & Bramley, 2004).

Os primeiros estudos com ênfase nos processos de isomerização *trans* $\leftrightarrow$ *cis* foram relatados no trabalho de Zechmeister (1944) que estudou o padrão de  $\beta$ -caroteno. Já os primeiros estudos sobre a oxidação de carotenóides com influência de diferentes fatores externos, tais como temperatura e presença de oxigênio, foram registrados nos trabalhos de Cole & Kapur (1957) que estudaram o licopeno. Karrer & Solmssen (1937) foram os primeiros pesquisadores a estudar a oxidação de carotenóides com o uso de agentes oxidantes específicos utilizando permanganato de potássio para oxidar  $\beta$ -caroteno. Para a produção específica de epóxidos de diferentes carotenóides, Karrer & Jucker (1945) utilizaram ácido monoperftálico, que foi substituído por MCPBA para a epoxidação de  $\beta$ -caroteno (Berset & Marty, 1992), devido à sua maior estabilidade.

### 3.2 Degradação térmica de carotenóides

Durante o aquecimento, os carotenóides sofrem mudanças estruturais que incluem: (1) isomerização *trans* $\leftrightarrow$ *cis*, (2) epoxidação (ou formação de epóxidos), (3) rearranjo de epóxido para furanóide, (4) clivagem oxidativa e (5) degradação com formação de compostos voláteis. As quatro últimas mudanças estruturais são reações irreversíveis e acarretam em perdas parciais e/ou totais na cor, enquanto a isomerização *trans* $\leftrightarrow$ *cis* não implica em grandes alterações na cor (Figura 1) (Borsarelli & Mercadante, 2010). Os efeitos sejam benéficos ou maléficos, da ingestão desses compostos de degradação no organismo humano ainda não foram totalmente elucidados.

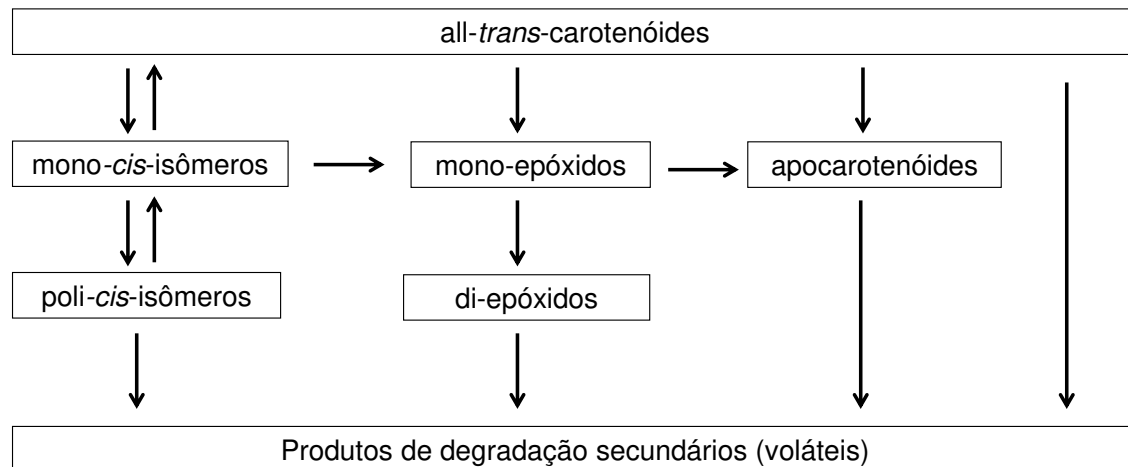


Figura 1. Principais mudanças estruturais que ocorrem durante aquecimento de carotenóides. Adaptado de Borsarelli & Mercadante (2010).

Mercadante (2008) apresentou resumidamente algumas características observadas em sistemas-modelo de degradação de carotenóides submetidos ao aquecimento: (1) a isomerização é a principal reação que ocorre durante o aquecimento à pressão atmosférica e em temperaturas inferiores a 100 °C, (2) o isômero 13-*cis*-carotenóide normalmente é formado em maiores quantidades que o 9-*cis*-carotenóide, (3) a formação de produtos de degradação como epóxidos, apocarotenóides e di-*cis*-isômeros ocorre em condições mais severas, como, longo tempo de exposição à alta temperatura e/ou alta pressão, (4) os produtos de degradação não voláteis formados durante o aquecimento, detectados por HPLC-DAD, normalmente são encontrados em menor quantidade do que o total de carotenóide degradado, indicando que compostos voláteis também são formados durante a degradação térmica (Mercadante, 2008; Zepka et al., 2009).

O estudo da degradação de carotenóides presentes nos alimentos é complexo devido à influência de muitos fatores simultaneamente, tais como a presença de ácidos e enzimas. Desta forma, é comum estudar o comportamento dos componentes presentes nos alimentos isoladamente, por meio de sistemas-modelo (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Na maioria dos estudos utilizando sistemas-modelo e com alimentos fontes de carotenóides, a degradação térmica de carotenóides apresenta um comportamento cinético de primeira ordem (Chen, Chen & Chien, 1994; Chen & Huang, 1998; Henry, Catignani & Schwartz, 1998; Ahmed, Shivare & Sandhu, 2002; Dhuique-

Mayer et al., 2007). Em contrapartida, Rios, Borsarelli & Mercadante (2005) e Zepka et al. (2009), apresentaram cinéticas bi-exponenciais, ou seja reações cinéticas de primeira ordem com dois estágios, para explicar diferentes reações que ocorrem simultaneamente em carotenóides, como por exemplo, as reações reversível (isomerização) e irreversível (formação de produtos de oxidação).

### 3.2.1 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno

A degradação de  $\beta$ -caroteno em diferentes sistemas-modelo, sob aquecimento, foi avaliada por Marty & Berset, 1986, 1988,1990 e Berset & Marty, 1992 nas seguintes condições: (i)  $\beta$ -caroteno, amido e água extrusados, (ii)  $\beta$ -caroteno em ampolas seladas, (iii)  $\beta$ -caroteno em frascos com circulação de ar e (iv)  $\beta$ -caroteno, amido e água não extrusados na mesma proporção do sistema (i). Os sistemas (ii, iii, iv) foram aquecidos a 180 °C durante 2 horas, e no sistema (i) foi utilizado uma extrusora em escala piloto. Após o aquecimento, o *all-trans* e os isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno foram separados e identificados por cromatografia preparativa e HPLC com UV-visível a 420 nm. Quanto a formação de compostos oxidativos, nos sistemas (i) e (iv) foram identificados: 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno (*cis* e *trans*), 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno (*cis* e *trans*), 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-15-carotenal,  $\beta$ -apo-14'-carotenal, 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal e  $\beta$ -caroten-4-ona. No sistema (ii), os mesmos compostos foram formados com exceção de 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-14'-carotenal, 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -apo-12'-carotenal. No sistema (iii), foram formados os compostos acima, com exceção do  $\beta$ -apo-14'-carotenal. Baseando-se nos sistemas acima, Marty & Berset (1986) propuseram uma seqüência de reações para a formação de epóxidos de  $\beta$ -caroteno durante o aquecimento (Figura 2).



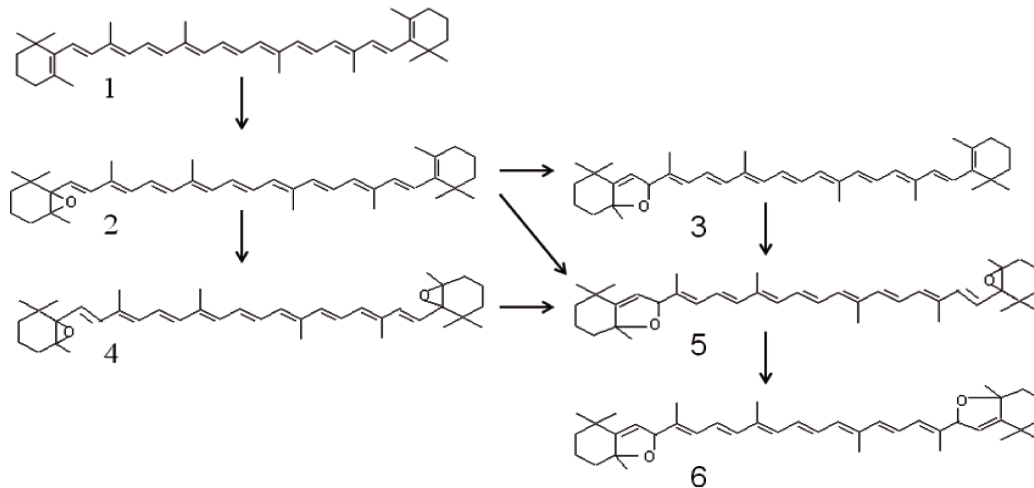


Figura 2. Seqüência de reações para a formação de epóxidos de  $\beta$ -caroteno durante o aquecimento. 1) *all-trans*- $\beta$ -caroteno; 2) 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno; 3) 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno; 4) 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno; 5) 5,8:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno; 6) 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno. Fonte: Marty & Berset (1986).

No mesmo trabalho (Marty & Berset, 1986), em relação aos isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno, no sistema (i) ocorreu a formação de 13,13'-*di-cis*- $\beta$ -caroteno, 9,13'-*di-cis*- $\beta$ -caroteno, 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9,9'-*di-cis*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno; enquanto que no sistema (ii), somente foram isolados 13,13'-*di-cis*- $\beta$ -caroteno, 9,9'-*di-cis*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Estes resultados mostram que o aquecimento por 2 horas a 180 °C em ampolas seladas resultou em um número mais limitado de isômeros de *all-trans*- $\beta$ -caroteno quando comparado ao processo de extrusão na mesma temperatura e tempo de exposição inferior (Marty & Berset, 1990). Além disto, a quantidade de compostos de degradação não voláteis detectados após aquecimento em sistema de extrusão permaneceu entre 10 e 20 % do teor inicial de  $\beta$ -caroteno (Berset & Marty, 1992). A presença de constituintes de alimentos, como água e amido, combinados com mistura mecânica nos sistemas (i) e (iv) favoreceu a difusão do oxigênio e levou à formação de um maior número de compostos de degradação com perdas mais elevadas de *all-trans*- $\beta$ -caroteno, enquanto que nos sistemas (ii) e (iii) foram detectados menores quantidades de produtos de degradação.

Aman, Schieber & Carle (2005), após aquecimento do padrão de *all-trans*- $\beta$ -caroteno dissolvido em tolueno e aquecido sob atmosfera de nitrogênio a 98 °C durante 60 minutos verificaram que houve uma retenção de 84,7 % no conteúdo de carotenóides

totais. O all-*trans*- $\beta$ -caroteno foi convertido parcialmente para seus isômeros *cis*, de forma que o 13-*cis* aumentou de 6 % para 28 % e o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno de 2 % para 5 % após o aquecimento.

A degradação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno foi avaliada durante o aquecimento de óleo de semente de cártamo a 75 °C/24 horas, 85 °C/12 horas e 95 °C/5 horas, na presença de ar, por meio de HPLC-DAD. Para estes dois carotenóides, os modelos de degradação foram de primeira ordem, com constantes de degradação semelhantes, sem diferença significativa. Além disto, durante o aquecimento do all-*trans*- $\beta$ -caroteno, todas as temperaturas avaliadas levaram à formação do isômero 13-*cis* em maiores quantidades, seguido da formação de 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e de outro isômero não identificado. Entretanto, a caracterização dos outros produtos formados não foi realizada (Henry, Catignani & Schwartz, 1998).

Recentemente, Achir et al. (2010) estudaram a degradação do  $\beta$ -caroteno em óleo de palma e em óleo de fritura comercial (Vegetaline<sup>®</sup>) entre 120 e 180 °C. Em ambos os óleos, a degradação de  $\beta$ -caroteno aumentou com o aumento da temperatura, sugerindo a ocorrência de um mecanismo de auto-catálise, com taxas de degradação da forma *trans* mais baixas em Vegetaline<sup>®</sup> do que em óleo de palma. Esta diferença foi atribuída à composição inicial dos óleos, devido às diferenças na composição de ácidos graxos, teor de peróxidos e vitamina E. Os isômeros 13-*cis* e 9-*cis* foram identificados em todas as condições analisadas.

Liu & Chen (1998), em estudo com sistemas-modelo contendo  $\beta$ -caroteno, clorofila *a* e três diferentes ésteres de ácidos graxos (metil estearato, oleato e linoleato) observaram a formação dos isômeros 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis* e 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno durante o aquecimento a 60 °C por 90 min e a 120 °C por 30 min. Nas duas temperaturas avaliadas, houve maior degradação do  $\beta$ -caroteno na presença de metil estearato, seguido dos sistemas com metil oleato e metil linoleato. Para os autores, este último sistema apresentou menor taxa de degradação do  $\beta$ -caroteno provavelmente porque o metil linoleato competiu pelo oxigênio e, conseqüentemente, uma menor quantidade de oxigênio permaneceu disponível para reagir com o  $\beta$ -caroteno.

Quatro isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno (13,15-di-*cis*-, 15-*cis*-, 13-*cis*- e 9-*cis*-) foram estudadas durante o aquecimento a 50, 100 e 150 °C de cristais de all-*trans*- $\beta$ -caroteno (Chen, Chen & Chien, 1994). Somente em 150 °C foi observada a formação de isômeros, sendo os majoritários o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, enquanto 15-*cis* e 13,15-di-

*cis*- $\beta$ -caroteno formaram-se em menores quantidades. Vale salientar que pelo fato dos carotenóides estarem na forma de cristais, estes apresentaram maior estabilidade (Gaier, Angerhofer & Wolf, 1991).

Cristais de all-*trans*- $\beta$ -caroteno foram aquecidos em dois sistemas: em forno a 50, 100, 125 e 150 °C, por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, e em hexano em sistema de refluxo a 70 °C, de 10 até 140 min (Chen & Huang, 1998). Observou-se que 13-*cis* e 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno foram os isômeros *cis* majoritários formados durante o aquecimento em forno, enquanto que 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foi o isômero mais favorecido durante o aquecimento em refluxo (Chen & Huang, 1998).

Qiu, Chen & Li (2009) avaliaram o efeito do aquecimento na estabilidade de all-*trans*- $\beta$ -caroteno cristalizado, aquecido no escuro a 40, 90 e 140 °C por 14 dias, na presença e ausência de ar (tubos saturados com nitrogênio). Como esperado, os resultados mostraram que o aumento da temperatura de aquecimento acelerou as reações de degradação e as amostras expostas ao ar oxidaram mais rápido do que as amostras em presença de nitrogênio, considerando as mesmas temperaturas de aquecimento. Neste mesmo trabalho, os autores sugeriram que além da formação de compostos de degradação de  $\beta$ -caroteno também tenha ocorrido polimerização. Entretanto, os polímeros formados não foram identificados.

Com a finalidade de avaliar a degradação de carotenóides, foi realizado o cozimento de brócolis, couve e repolho crespo em água fervente por um período de 10 min, e de espinafre por 3 minutos (O'Sullivan et al., 2010). Os autores mostraram que a isomerização de  $\beta$ -caroteno ocorreu apenas em brócolis e espinafre, concluindo que a matriz é um fator de bastante influência durante o aquecimento. Outros estudos também mostraram a influência da matriz na degradação de carotenóides: Chen, Peng & Chen (1995) verificaram que o processamento a 121 °C realizado com cenouras em conserva provocou, predominantemente, a formação de 13-*cis*- $\beta$ -caroteno; Chandler & Schwartz (1988) observaram que o processamento térmico da batata doce induziu a formação de 13-*cis*- $\beta$ -caroteno; Marx et al. (2003) observaram que a pasteurização provocou apenas a formação do isômero 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, enquanto que a esterilização provocou a formação de 13-*cis* e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Além disso, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno foi somente encontrado em temperaturas superiores a 90 °C e tempos de processamento superiores a 60 min.

Muitos trabalhos, portanto, avaliaram o efeito do aquecimento do  $\beta$ -caroteno, sob diversas condições, na formação de produtos de degradação. Entretanto, a capacidade

antioxidante dos compostos de degradação do  $\beta$ -caroteno não foi relatada em nenhum dos sistemas com degradação térmica apresentados anteriormente.

### 3.3 Degradação química de carotenóides

O número de estudos que investigam a degradação química de carotenóides tem aumentado nos últimos anos para a obtenção, preferencialmente, de produtos de oxidação que têm sido identificados na composição de muitos alimentos processados e que também parecem estar envolvidos na modulação de vias de sinalização intracelular (Palozza et al., 2009). Para isso, alguns agentes oxidantes têm sido estudados e aplicados, entre os quais destacam-se os perácidos e o  $\text{KMnO}_4$ .

Os perácidos, como o ácido MCPBA ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClO}_3$ ), são reagentes orgânicos capazes de inserir um oxigênio na ligação dupla carbono-carbono formando epóxidos via ataque eletrofílico (Figura 3). Em carotenóides, como o  $\beta$ -caroteno, esse ataque ocorre preferencialmente na ligação dupla do carbono terminal da cadeia poliênica, a qual possui a maior densidade eletrônica da cadeia poliênica, ou seja, nas posições 5,6 e 5',6' (Caris-Veyrat, 2010).

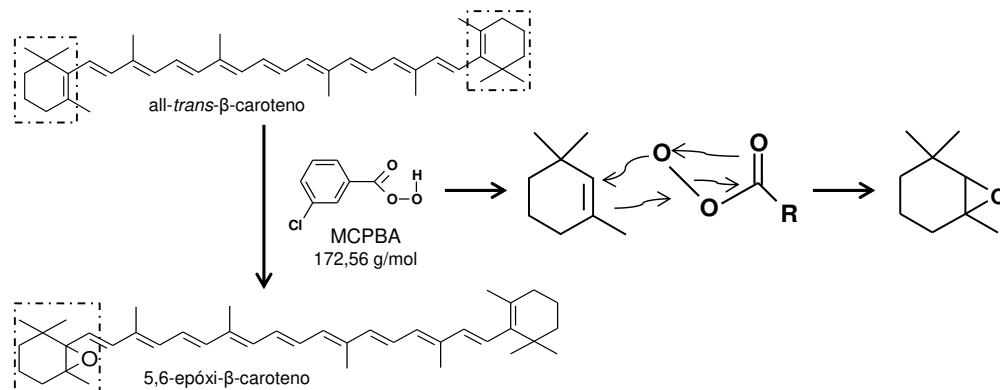


Figura 3. Mecanismo de epoxidação de  $\beta$ -caroteno com MCPBA. Fonte: modificado de Ambros & Schuch (1997) e Burke & Danheiser (1999).

Normalmente a epoxidação de carotenóides com perácidos é realizada em solventes polares apróticos, como o tetraidrofurano (Khachik et al., 1998) e diclorometano (Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2007 e 2009), porém sistemas bifásicos de solventes, como diclorometano/água, também têm sido utilizados (Ambros & Schuch, 1997). Além

disto, este tipo de reação é estereoespecífica, ou seja, um carotenóide *trans* origina um epóxido *trans* e um carotenóide *cis*, origina um epóxido *cis* (Burke & Danheiser, 1999).

Existem alguns estudos sobre a formação de epóxidos de carotenóides a partir da reação com MCPBA, sendo já descritos epóxidos e/ou diepóxidos de luteína, zeaxantina (Barua, 1999), cantaxantina (Ztircher & Pfander, 1999), licopeno (Khachik, Beecher & Lusby, 1989; Caris-Veyrat et al., 2003 e Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2009) e de  $\beta$ -caroteno (Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2007; Ribeiro, 2011).

O  $\text{KMnO}_4$  é outro agente químico que reage com as ligações duplas conjugadas dos carotenóides gerando diferentes tipos de compostos. O uso de permanganato de potássio propicia a clivagem oxidativa das ligações duplas conjugadas formando apocarotenóides sem oxidação adicional para a função ácido carboxílico. A etapa inicial da reação envolve a adição eletrocíclica [3 + 2] do íon permanganato na ligação  $\pi$  formando o éster cíclico hipomanganato Mn(V) (Figura 4) (Fatiadi, 1987).

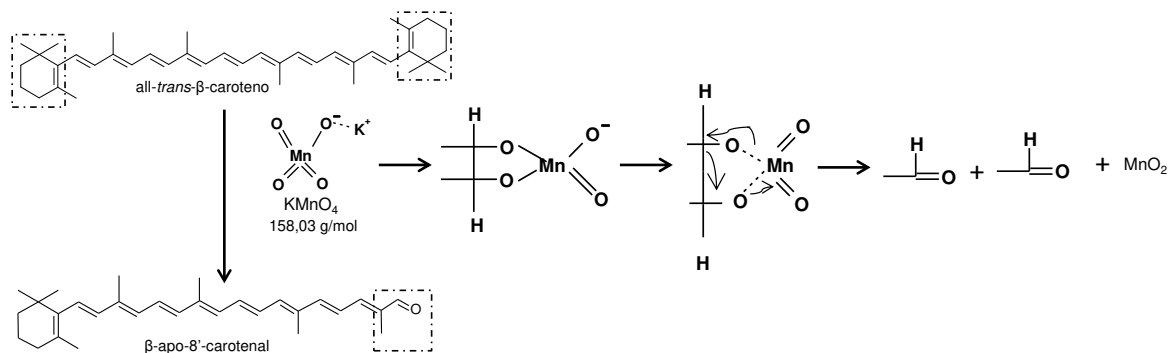


Figura 4. Mecanismo da clivagem oxidativa das ligações duplas carbono-carbono por meio de  $\text{KMnO}_4$  para formação de apocarotenóides. Fonte: modificado de Fatiadi (1987).

A formação de apocarotenóides por meio da reação com  $\text{KMnO}_4$  foi estudada recentemente por Caris-Veyrat et al. (2003) e Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2009) que produziram apocarotenóides de licopeno, e Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007) que produziram apocarotenóides de  $\beta$ -caroteno, com o objetivo de monitorar os compostos iniciais, intermediários e finais em sistemas mais controlados quando comparados aos sistemas alimentícios.

### 3.3.1 Degradação química de $\beta$ -caroteno

Utilizando MCPBA como oxidante, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno e 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno foram os principais produtos identificados por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007) com o objetivo de facilitar a identificação destes carotenóides em alimentos processados, como damasco seco, suco de manga e de acerola. Os derivados de 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- $\beta$ -caroteno também foram obtidos através da reação do  $\beta$ -caroteno com MCPBA (Ribeiro, 2011). Até o momento, não foram encontrados outros trabalhos utilizando MCPBA como oxidante sobre o  $\beta$ -caroteno.

Utilizando o oxidante  $\text{KMnO}_4$ , apocarotenóides foram também produzidos a partir de  $\beta$ -caroteno por Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007). Os autores identificaram  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-14'-carotenal e  $\beta$ -apo-15-carotenal, além dos compostos semi- $\beta$ -carotenona e 5,8-epóxido- $\beta$ -caroteno.

Outros estudos com diferentes reagentes também foram realizados para oxidar  $\beta$ -caroteno. Caris-Veyrat et al. (2001) realizaram a clivagem oxidativa de all-*trans*- $\beta$ -caroteno por oxigênio molecular na presença de tetramesitil porfirina de rutênio. Esse sistema foi escolhido porque desacelera o processo de oxidação, e assim, um maior número de compostos intermediários pode ser identificado. A degradação com três pontos (0, 6 e 24 horas) monitorada por HPLC-DAD e HPLC-MS mostrou inicialmente a formação de isômeros, como 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, em seguida a formação de epóxidos (5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno), apocarotenóides (C8', C10', C12', C14', C15, C11, C7), apocarotenonas (C13, C9), epóxi-apocarotenos (E5,6 C8', E5,8 C8', E5,6 C14', E5,6 C11, E5,8 C11, E5,8 C8), epoxicarotenonas (E5,6 C13, E5,8 C13) e finalmente di-diapocarotenóides (C9,8', C13,8').

A oxidação de  $\beta$ -caroteno em hexano via radical peroxila gerado a partir de azobis(2,4-dimetil-valeronitrila) (AMVN), teve como produtos 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 5,8:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno (Lieber & Kennedy, 1992). Neste trabalho, o maior rendimento de epóxidos ocorreu após 12 horas quando o mesmo se aproximou de 20 % do consumo de  $\beta$ -caroteno, além disto, os epóxidos formados foram gradualmente consumidos entre 12 e 24 horas de reação.

Benevides et al. (2011) estudaram os produtos de  $\beta$ -caroteno oxidados por meio de atmosfera de ozônio. Catorze produtos de oxidação (15-apo- $\beta$ -carotenal, ácido

pirúvico, ácido 5,9,13,13-tetrametil-12,17-dioxo-octadec-2,4,6,8,10-pentenóico, 14'-apo- $\beta$ -carotenal, 3,7,11,11-tetrametil-10,15-dioxo-hexadec-2,4,6,8-tetra-enal, 2-metil-buteno-2-dial, glioxal, metilglioxal,  $\beta$ -ciclocitral, 6,6-dimetil-undec-3-en-2,5,10-trione, 4,9,13,17,17-pentametil-16,21-dioxo-docos-2,4,6,8,10,12,14-heptaenal, 12'-apo- $\beta$ -carotenal, 5,6-epóxi-12'-apo- $\beta$ -carotenal e 5,6 epóxi-10'-apo- $\beta$ -carotenal) foram identificados. Nesse estudo, a degradação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno foi de 17 a 99 % e seguiu modelo de zero ordem, apresentando tendência sigmoideal. Reações com comportamento sigmoideal apresentam três diferentes fases: i) período de indução, ii) fase principal, onde a reação é acelerada e iii) fase de baixo decaimento (Mínguez-Mosquera, 1997).

Além dos estudos citados anteriormente, Handelman et al. (1991) e Sommerburg et al. (2003) estudaram a degradação química de  $\beta$ -caroteno com hipoclorito e Woodal et al. (1997) com oxidantes gerados pela reação de Fenton e com radical peroxila. No entanto, em todos os trabalhos acima mencionados a capacidade antioxidante e as propriedades de cor durante as reações químicas não foram avaliadas.

### 3.4 Cor

A cor, juntamente com o sabor e a textura, são os três principais atributos de qualidade do alimento. Entretanto, o impacto causado pela cor, normalmente, sobrepõe-se ao impacto causado pelos demais atributos. Isso ocorre porque as cores constituem o primeiro critério aplicado para a aceitação ou rejeição de um alimento. Desta forma, a avaliação da cor durante a degradação térmica e química de pigmentos pode ser utilizada como um método indireto para estimar algumas das alterações que ocorrem nos alimentos processados, que são fortemente dependentes das características físico-químicas dos pigmentos e do meio em que estes se encontram.

As alterações de cor podem ser medidas por diferentes métodos, como por exemplo, pela aplicação das coordenadas do sistema espacial CIELAB. Este sistema consiste em um diagrama tridimensional de cores ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) (Figura 5), onde  $L^*$  indica a luminosidade,  $a^*$  a cromaticidade tendendo do verde (-) ao vermelho (+) e  $b^*$  a cromaticidade que varia do azul (-) ao amarelo (+). A partir dos valores numéricos de  $a^*$  e  $b^*$  pode ser calculado o croma ( $C_{ab}^*$ ), que indica a saturação da cor, e a tonalidade ( $h_{ab}$ ), também conhecida como ângulo hue que é o valor em graus correspondente ao diagrama

tridimensional de cores: 0° (vermelho), 90° (amarelo), 180° (verde) e 270° (azul), parâmetro este que corresponde a tonalidade tal como é vista pelo olho humano.

Tradicionalmente, três tipos de equipamentos podem ser utilizados para analisar a cor no sistema espacial CIELAB: colorímetros, espectrorradiômetros e espectrofotômetros. Os dados gerados nessas análises de cor são definidos numericamente, e influenciados por três principais características: (i) fonte da luz visível, (ii) objeto e (iii) observador, além de outros parâmetros como (iv) a largura do objeto, (v) geometria do observador e do iluminante que também são importantes de serem observados.

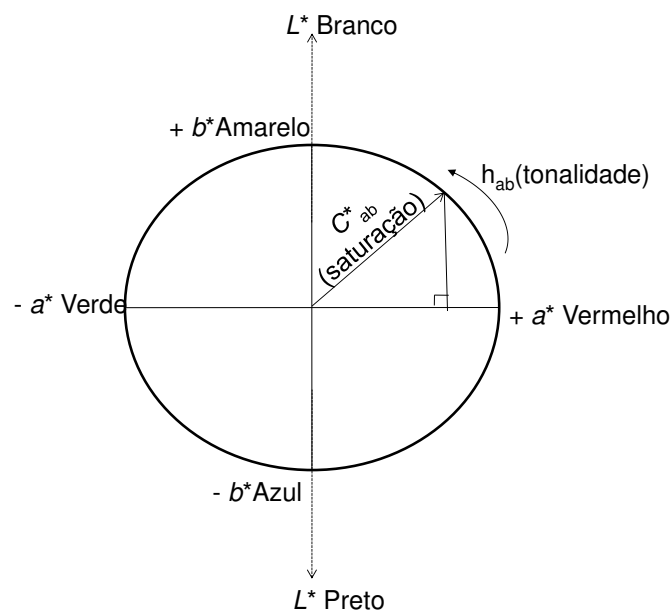


Figura 5. Coordenadas do sistema espacial CIELAB.

### 3.4.1 Efeito da degradação de carotenóides na cor

Muitos estudos têm relacionado a cor com o conteúdo de carotenóides em diversos alimentos, entretanto, poucos trabalhos estudaram a relação de ambos resultados. Meléndez-Martínez et al. (2007), através do diagrama CIELAB, estudaram o comportamento de 16 padrões de carotenóides (anteraxantina, auroxantina, cantaxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, epóxi-luteína, luteoxantina, licopeno, mutatoxantina, neocromo, neoxantina, violaxantina e zeaxantina). Estes



carotenóides foram agrupados relacionando o plano  $a^*$ ,  $b^*$  e sua estrutura química. A cantaxantina (13 ligações duplas conjugadas) e o licopeno (11 ligações duplas conjugadas com estrutura acíclica) permaneceram no primeiro quadrante (valores positivos de  $a^*$  e  $b^*$ ) diferentemente dos demais padrões, que permaneceram no segundo quadrante, valores negativos de  $a^*$  e positivos para  $b^*$ . Em termos de  $h_{ab}$  foi observado que, com a diminuição do número de ligações duplas conjugadas ocorreu um ligeiro aumento desse parâmetro.

A diferença global de cor ( $\Delta E^*$ ), que indica a diferença de cor entre dois tratamentos, é matematicamente definida pela raiz quadrada do somatório dos quadrados de  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$ . Francis & Clydesdale (1975) reportaram que um valor de  $\Delta E^*$  igual ou superior a dois pode ser considerado como uma diferença entre dois tratamentos perceptivelmente visível ao olho humano. Analisando amostras de vinho tinto, Martínez et al. (2001) observaram que uma diferença de 3 unidades no  $\Delta E^*$  foram perceptíveis pelo olho humano. Lee & Coates (2003) observaram valores de  $\Delta E^*$  superiores a 2 após pasteurização, 90 °C por 30 segundos, de suco de laranja cultivar Valência; e essa alteração foi atribuída à transformação de 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno para 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno. Além disto, sob perspectiva industrial,  $\Delta E^*$  com valores de 1,1 até 2,8 unidades na escala CIELAB apresentam-se como um rigoroso padrão de qualidade, valores entre 2,8 a 5,6 unidades como um padrão “normal” e um “baixo padrão” de qualidade quando os valores de  $\Delta E^*$  encontram-se acima de 5,6 unidades (Melgosa et al., 2001).

Modelos cinéticos de zero e primeira ordem têm sido aplicados para explicar a degradação da cor em produtos ricos em carotenóides, ajudando na otimização das condições de processamentos térmicos que requerem dados cinéticos, tais como a constante de degradação ( $k$ ) a uma determinada temperatura e energia de ativação ( $E_a$ ). Ahmed, Shivare & Sandhu (2002) avaliaram a cinética de mudança da cor e a degradação de carotenóides em purê de mamão processado em temperaturas entre 70 e 105 °C. A degradação seguiu modelo cinético de primeira ordem com correlação linear entre a degradação de carotenóides e a mudança de cor, que foi baseada nos valores de  $a$  e  $b$  (sistema Hunter).

Zepka et al. (2009) estudaram a degradação térmica de all-*trans*- $\beta$ -criptoxantina, all-*trans*- $\beta$ -caroteno e alterações de cor em sistema simulador de suco de caju a 60 e 90 °C. Os autores relataram curvas de degradação (dos carotenóides e das mudanças de cor) com um comportamento cinético bi-exponencial. Os parâmetros cinéticos revelaram

constantes de decaimento na fase rápida ( $\gamma_1$ ) e lenta ( $\gamma_2$ ) similares para os parâmetros químicos (conteúdo de carotenóides) e físicos (cor) nas temperaturas estudadas. Outros trabalhos também reforçam as correlações entre parâmetros físicos e químicos, como por exemplo, Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia (2003), que observaram correlações significativas entre  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h_{ab}$ , teor de  $\beta$ -criptoxantina, luteína mais zeaxantina e  $\beta$ -caroteno em suco de laranja. Nesse trabalho, a partir dos modelos de equações múltiplas, foi obtida a determinação dos níveis individuais de carotenóides por meio dos parâmetros cor (escala CIELAB), com valores de  $r$  superiores a 0,9.

Desta forma, observa-se que alguns parâmetros de cor podem ser usados para monitorar a variação do teor total de carotenóides durante o processamento de alimentos, de maneira muito mais rápida e prática, quando comparado com a análise de carotenóides totais.

### 3.5 Capacidade antioxidante de carotenóides

Um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas à de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato (Halliwell & Gutteridge, 2007). Por essa definição pode-se inferir que a capacidade de uma substância antioxidante não é um valor absoluto, mas depende do meio, da fonte de estresse e do alvo (substrato oxidável). Esse é o motivo pelo qual métodos distintos originam diferentes valores relativos de capacidade antioxidante, e, por esta razão, diversas técnicas de análise com diferentes mecanismos de reação têm sido aplicadas para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* dos carotenóides.

A capacidade antioxidante dos carotenóides é independente da atividade pró-vitamina A, e está associada ao extenso sistema de ligações duplas conjugadas, bem como com o tipo de grupo terminal e a presença de grupos funcionais. Carotenóides com nove ou mais ligações duplas conjugadas apresentam melhor capacidade de desativar radicais livres, de desativar o oxigênio singlete e de transferir elétrons (Burton & Ingold, 1984; Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003; Edge et al., 2007). Além disso, a estrutura química do carotenóide (ex: tamanho, forma e número de grupos substituintes), a presença e as interações com outros antioxidantes (ex: vitaminas C e E), a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), a forma física (ex: formação de agregados e configuração *cis* ou *trans*) e as características físicas e químicas do meio (ex: polaridade,

concentração de reagentes, presença de oxigênio, meio aquoso ou lipídico), entre outras condições da análise, influenciam de maneira significativa os resultados obtidos em testes que avaliam a capacidade antioxidante (Burton & Ingold, 1984; Miller et al., 1996; Young & Lowe, 2001; Rietjens et al., 2002; El-Agamey & Mcgarvey, 2003; El-Agamey et al., 2004; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006; Edge et al., 2007).

Entre os métodos *in vitro* mais usados para avaliar a capacidade antioxidante em alimentos, estão o método de desativação do ABTS<sup>•+</sup> 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) (Rodriguez-Amaya, 2010).

### 3.5.1 Método de desativação do radical ABTS<sup>•+</sup>

O método de desativação do radical ABTS foi primeiramente relatado por Miller et al. (1993), e posteriormente, Re et al. (1999) que propuseram algumas modificações. Neste método, a oxidação do ABTS com persulfato de potássio gera o radical estável ABTS<sup>•+</sup> com a conseqüente formação de um cromóforo verde azulado de cor intensa com absorção máxima a 645, 734 e 815 nm (Figura 6) (Thomas et al., 2004; Huang, Ou & Prior, 2005).

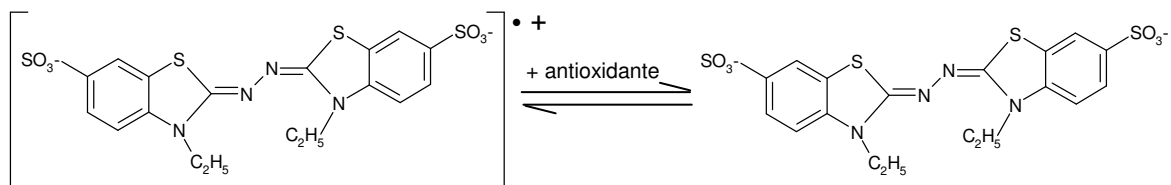


Figura 6. Formação e desativação do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>. Fonte: Huang, Ou & Prior (2005).

Depois de formado, o ABTS<sup>•+</sup> pode ser reduzido na presença de antioxidantes perdendo sua coloração. Através da redução do ABTS<sup>•+</sup> é determinada a porcentagem de inibição em função da concentração do antioxidante e o cálculo da capacidade antioxidante é relativo à reatividade do padrão trolox, composto hidrofílico análogo à vitamina E. Assim, o resultado é expresso como TEAC (capacidade antioxidante equivalente em trolox).

Apesar de muita discussão sobre o uso do ABTS<sup>•+</sup> pelo fato de ser um radical não encontrado em sistemas biológicos, o método TEAC vem sendo muito utilizado para analisar compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, isolados e também presentes em alimentos e bebidas sob diferentes sistemas devido à sua popularidade, facilidade de manipulação, custo acessível, rapidez da análise e estabilidade em diferentes faixas de pH.

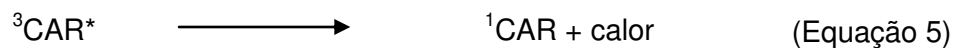
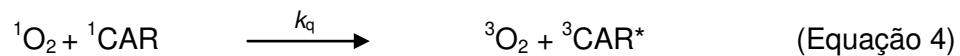
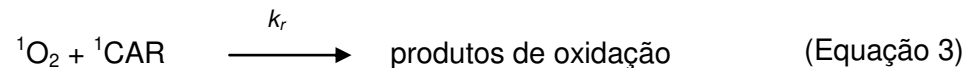
### 3.5.2 Método de desativação do oxigênio singlete ( $^1O_2$ )

O primeiro relato que comprovou a eficiência dos carotenóides como desativadores de  $^1O_2$  foi publicado por Foote & Denny (1968). Os autores utilizaram azul de metileno como sensibilizador em um sistema-modelo com  $\beta$ -caroteno com diferentes concentrações de 2-metil-2-penteno. Os resultados mostraram uma redução de até 95 % na formação do hidroperóxido de 2-metil-2-penteno em presença de  $\beta$ -caroteno. Atualmente, a avaliação da ação de carotenóides na desativação de espécies excitadas com o uso de sistemas-modelo vem sendo realizada por muitos autores (Yamauchi et al., 1993; Montenegro et al., 2002; Montenegro et al., 2004; Rios, Borsarelli & Mercadante, 2005; Faria et al., 2010).

O  $^1O_2$ , forma de oxigênio altamente reativa, pode ser gerado por meio de processos físicos, químicos e fotoquímicos. Dentre os processos fotoquímicos, a fotossensibilização pode ocorrer intracelularmente ou em solução por meio de mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado de uma molécula orgânica ou inorgânica, conhecida como sensibilizador (S), para o oxigênio molecular no estado eletrônico fundamental triplete ( $^3O_2$ ) (equações 1 e 2). Em sistemas biológicos, moléculas como clorofila, hematoporfirinas e riboflavina absorvem luz na região visível e atuam como sensibilizadores, enquanto em solução, alguns corantes artificiais, tais como rosa de bengala e azul de metileno, também cumprem eficientemente essa função (Stahl & Sies, 1993).

Assim, na presença de antioxidantes, como carotenóides, o  $^1O_2$  gerado pode ser desativado via processo químico (*quenching* químico), com formação de produtos de oxidação (equação 3); ou mediante processo físico (*quenching* físico) (equação 4 e 5), que envolve a transferência da energia de excitação do  $^1O_2$  para o carotenóide resultando na formação de oxigênio no seu estado fundamental ( $^3O_2$ ) e carotenóide no estado triplete

excitado ( $^3\text{CAR}^*$ ). Em seguida, a energia do carotenóide excitado é dissipada para o meio na forma de calor, e o carotenóide pode inativar outro oxigênio singlete (Stahl & Sies, 1993; Stratton, Schaefer & Liebler, 1993; Sthal & Sies, 2003).



### 3.5.3 Capacidade antioxidante/pró-oxidante de $\beta$ -caroteno e de seus produtos de degradação

Burton & Ingold (1984) verificaram que em condições de pressão de oxigênio menor que 0,19 bar, pressão de oxigênio normal do ar encontrada na maioria dos tecidos em condições fisiológicas, o  $\beta$ -caroteno é um bom agente antioxidante. Entretanto, em alta pressão de oxigênio, como ocorre no pulmão de fumantes, o  $\beta$ -caroteno perde a capacidade antioxidante, e pode desempenhar ação pró-oxidante e auto-catalítica.

Em relação aos estudos *in vitro* com enfoque na capacidade antioxidante de diferentes padrões de carotenóides, Miller et al. (1996) compararam a capacidade antioxidante de diferentes carotenos e xantofilas em sistemas homogêneos através da sua capacidade em desativar o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Os resultados mostraram que a 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  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  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 >  $\beta$ -caroteno ~  $\beta$ -criptoxantina > luteína ~ zeaxantina >  $\alpha$ -caroteno > cantaxantina = astaxantina. O licopeno, portanto, apresentou valor de TEAC superior (2,9) ao  $\beta$ -caroteno (1,3), sendo

este resultado atribuído, como já citado anteriormente, à diferença estrutural existente entre ambos. Apesar de possuírem onze ligações duplas conjugadas, o licopeno mostrou-se mais efetivo devido ao fato de duas ligações duplas da molécula do  $\beta$ -caroteno estarem localizadas nos anéis ciclohexano, os quais não estão no mesmo plano do restante da molécula, fazendo com que sua contribuição no sistema de ligações duplas conjugadas seja menor (Jiménez-Escrig et al., 2000). Barreto (2008) estudou a capacidade de desativação do radical  $ABTS^{*+}$  apresentada pelos padrões de carotenóides ( $\beta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, astaxantina,  $\beta$ -apo-10'-carotenal e  $\beta$ -apo-12'-carotenal). O maior valor de TEAC foi obtido para o  $\beta$ -caroteno. Além disso, os resultados mostraram que a concentração, o número de ligações duplas conjugadas e a presença do grupo carbonila influenciaram na capacidade antioxidante.

Alguns carotenóides na forma *cis* também foram avaliados pelo método  $ABTS^{*+}$ : Bohm et al. (2002) evidenciaram que três isômeros *cis* (não identificados) de licopeno mostraram maiores valores de capacidade antioxidante quando comparados à forma *trans* e, quando comparados ao *all-trans*- $\beta$ -caroteno, esses isômeros apresentaram um valor de TEAC duas vezes maior. Por outro lado, os isômeros de  $\beta$ -caroteno (*all-trans*, *9-cis*, *13-cis* e *15-cis*) não apresentaram diferença significativa para os valores de TEAC.

Mueller & Boehm (2011) analisando os isômeros *all-trans*, *9-cis* e *13-cis*- $\beta$ -caroteno não detectaram diferenças significativas entre os valores da capacidade de desativação do radical  $ABTS^{*+}$ , expressando a capacidade antioxidante em equivalente de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ TEAC). Entretanto, *15-cis*- $\beta$ -caroteno apresentou-se menos ativo, provavelmente pela menor estabilidade ( $\alpha$ TEAC = 2,5). Neste mesmo trabalho, o composto etil éster do ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenóico apresentou valor de  $\alpha$ TEAC de 2,5 enquanto  $\beta$ -apo-8'-carotenal foi de 1,4. Ou seja, produtos de degradação, que ainda apresentam longa cadeia poliênica, não perderam totalmente a capacidade antioxidante.

A capacidade de desativação do radical  $ABTS^{*+}$  por produtos de oxidação oriundos da reação de epoxidação de  $\beta$ -caroteno com MCPBA foi estudada por Ribeiro (2011). O *all-trans*- $\beta$ -caroteno apresentou um valor de TEAC de 2,65 e a mistura de produtos de oxidação do  $\beta$ -caroteno, tais como 5,6:5',6'-diepóxido, 5,6:5',8'-diepóxido, *9-cis*-5,6:5',6'-diepóxido, 5,6-epóxido e 5,8-epóxido- $\beta$ -caroteno apresentaram capacidade de desativação deste radical cerca de 5 vezes menor que o *all-trans*. Uma alteração significativa na capacidade de reduzir o radical  $ABTS^{*+}$  foi verificada quando a diferença entre as proporções de mono e diepóxidos de  $\beta$ -caroteno foi maior que 50 %, ou seja, a

presença de grupos substituintes na estrutura do carotenóide ocasionou maior impacto na capacidade de desativação do ABTS<sup>•+</sup> do que a extensão do cromóforo (Ribeiro, 2011).

Entre as pesquisas com oxigênio singlete, Montenegro et al. (2002) estudaram o processo de desativação física ( $k_q$ ) e química ( $k_r$ ) de  $^1\text{O}_2$  por vários carotenóides, entre eles o  $\beta$ -caroteno, em micelas inversas com sensibilizador de rosa de bengala. A degradação dos compostos seguiu uma cinética de primeira ordem, e o valor de  $k_q$  aumentou com a extensão do número de ligações duplas conjugadas. Já a presença de grupos substituintes na estrutura diminuiu o valor de  $k_q$ , devido à maior diferença de energia entre os estados fundamentais e excitados dos carotenóides. A  $k_r$  foi independente do tipo de carotenóide e apresentou 4 ordens de magnitude menor que a  $k_q$ . Di Mascio, Kaiser & Sies (1989) observaram que os carotenóides apresentaram  $k_q$  variando de 5 a  $31 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . O licopeno foi o desativador mais eficiente ( $31 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), enquanto o  $\beta$ -caroteno apresentou valor de  $14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Corroborando com este resultado, Conn, Schalch & Truscott (1991) reportaram uma maior eficiência do licopeno ( $1,75 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) quando comparado ao  $\beta$ -caroteno ( $1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). A diferença de valores para o licopeno pode ser devido ao uso de diferentes solventes em cada trabalho.

Valores de  $k_q$  de  $11 \times 10^9$  e  $11 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  utilizando benzeno como solvente e valores de  $9 \times 10^9$  e  $12 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  utilizando tolueno como solvente foram obtidos com os padrões de 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, respectivamente (Conn, Schalch & Truscott, 1991). Já o all-*trans*- $\beta$ -caroteno apresentou valor de  $13 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  em benzeno, e  $14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  em tolueno. Ou seja, os isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno apresentaram valores ligeiramente inferiores em relação à forma all-*trans* (Conn, Schalch & Truscott, 1991). Além disto, a desativação de  $\beta$ -caroteno em  $\text{CHCl}_3$  apresentou a  $k_q$  de  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Devasagayam et al., 1992).

Hirayama et al. (1994) relacionaram a estrutura química e a capacidade de desativação de oxigênio singlete por  $\beta$ -caroteno, licopeno e  $\beta$ -criptoxantina. A abertura do anel  $\beta$  aumentou o potencial desativadora, como no caso do licopeno. Similarmente, substituições por grupos hidroxilas mostraram-se menos efetivas e grupos epóxidos e metílicos contribuíram para uma menor capacidade em desativar oxigênio singlete. Desta forma, as propriedades dos carotenóides dependem não apenas do comprimento do sistema de ligações duplas conjugadas, mas também dos grupos terminais e funcionais.

Pesquisas *in vivo* vêm mostrando que all-*trans*- $\beta$ -caroteno e seus produtos de degradação voláteis e não voláteis, os quais podem ser formados durante o aquecimento

e degradação química, podem exercer efeitos benéficos ou prejudiciais para a saúde humana. Por este motivo, estudos em sistemas abióticos são cada vez mais necessários para melhorar o entendimento da reatividade destes compostos.

Ao avaliar compostos não-voláteis, Barua (1999) observou que 5,6 e 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, foram mais ativos que  $\beta$ -caroteno na indução e diferenciação de células NB<sub>4</sub> (linhagem de célula leucemina promielocítica), Além disso, foram melhor absorvidos pelo organismo humano, com mais de 60 % de absorção após 6 horas da ingestão da dose consumida. Tibaduiza et al. (2002) verificaram que ácidos apocarotenóicos com diferentes números de ligações duplas conjugadas inibiram o crescimento de células do câncer de mama. Gradelet et al. (1996) mostraram que  $\beta$ -apo-8'-carotenal é um forte indutor da isoenzima citocromo P450 1A1 (CYP1A1) que possui uma importante função na ativação de xenobióticos a metabólitos tóxicos em ratos, enquanto que  $\beta$ -caroteno não foi ativo. Por outro lado, outros estudos mostraram que a mistura de produtos de oxidação voláteis e não voláteis do  $\beta$ -caroteno aumentaram a ligação de benzo[a]pireno ao DNA (Salgo et al., 1999), induziram o stress oxidativo *in vitro* (Augustin et al., 2002), inibiram junções de comunicação intracelulares (Yeh & Hu, 2003), apresentaram efeito citotóxico (Hurst et al., 2005; Kalariya et al., 2008) e genotóxico (Alija et al., 2006; Kalariya et al., 2009). Vale ressaltar que, esses efeitos prejudiciais podem ocorrer após a ingestão de altas doses de carotenóides (Caris-Veyrat, 2008), e que os compostos de degradação do all-*trans*- $\beta$ -caroteno, após serem gerados via degradação térmica, química ou bioquímica normalmente são detectados em quantidades muito menores quando comparados à forma all-*trans*.

Dessa forma, observa-se muita diversidade nas informações apresentadas pela literatura e, por conseqüência, algumas contradições em relação aos dados de capacidade antioxidante dos produtos de degradação de carotenóides, sendo assim verificada a necessidade de maiores estudos sobre o tema.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Padrões

Foram utilizados os seguintes padrões:  $\beta$ -caroteno (Sigma, EUA), 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox) (Sigma, EUA), 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal e  $\beta$ -apo-8'-carotenal (doados pela DSM Nutritional Products, Suíça).

### 4.2 Cristalização de $\beta$ -caroteno

Os cristais de all-*trans*- $\beta$ -caroteno foram obtidos a partir de duas cristalizações sucessivas, conforme procedimento descrito por Nunes & Mercadante (2004). Para verificar a eficácia da cristalização, a pureza do padrão foi determinada por HPLC (Waters, Milford, EUA), equipado com sistema quaternário de bombas (modelo 600), degaseificador *on line*, sistema de injeção *Rheodyne* de 20  $\mu$ L (Rheodyne LCC, EUA), forno externo com temperatura controlada e detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 996, EUA) e sistema de aquisição e processamento de dados em software Millennium Waters. Foi utilizada uma coluna C<sub>30</sub> YMC (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm id.) (Waters) e fase móvel com gradiente linear de metanol (MeOH) contendo 0,1 % de trietilamina (TEA)/éter metil *tert*-butílico (MTBE) de 95:5 para 70:30 em 30 min, para 50:50 em 20 min, com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 32 °C (De Rosso & Mercadante, 2007). A TEA foi utilizada para aumentar a recuperação dos carotenóides da coluna (Hart & Scott, 1995; Emenhiser et al., 1996). Os dados foram adquiridos e processados em software Millennium Waters, com os cromatogramas processados a 450 nm e os espectros adquiridos entre 260 e 600 nm (De Rosso & Mercadante, 2007). Os cristais foram observados em microscópio óptico (Carlzeiss, Alemanha), sob luz polarizada, com lentes objetivas de 12,5 e 25 x e optular de 1,25 x.

### 4.3 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno sólido em sistemas-modelo

Para o preparo da solução-estoque, os cristais de  $\beta$ -caroteno foram dissolvidos em

acetato de etila e submetidos por 20 min em banho ultra-sônico para garantir total solubilização. Após esse período, a concentração da solução-estoque foi medida em espectrofotômetro (Agilent, EUA) e calculada pela lei de Beer, utilizando o coeficiente de absortividade  $E_{1\text{cm}}^{\%}$  de 2592 (Britton, 1995). Uma alíquota foi pipetada em cada tubo de vidro silanizado com volume nominal de 10 mL para a obtenção de uma quantidade de 25  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno em cada um. Em seguida, o solvente foi totalmente evaporado com  $\text{N}_2$  até formar uma fina película de  $\beta$ -caroteno no frasco.

No experimento com a adição de galato de propila, o antioxidante foi previamente dissolvido em etanol e uma alíquota contendo 25  $\mu\text{g}$  foi adicionada em todos os tubos antes da adição do  $\beta$ -caroteno, de forma que houvesse a mesma concentração molar (1:1) de ambos os compostos. Posteriormente, os solventes foram totalmente evaporados com  $\text{N}_2$  até formar uma fina película de  $\beta$ -caroteno e galato de propila no frasco.

Todos os tubos foram aquecidos em bloco aquecedor (Marconi, Brasil) com controle digital de temperatura. As temperaturas de 120 °C e 150 °C foram escolhidas com base nas temperaturas usuais de processamento industrial de alimentos ricos em carotenóides.

Foram realizados seis experimentos, conforme condições apresentadas na Tabela 1 e, para cada tempo de aquecimento, pelo menos 10 tubos foram retirados em cada experimento.

Tabela 1. Condições utilizadas na degradação térmica de  $\beta$ -caroteno.

Temperatura de 120 °C	
Condição	Tempo de reação
Aquecimento na presença de ar	0 a 40 min
Aquecimento na presença de ar com adição de galato de propila	0 a 105 min
Aquecimento sob fluxo de oxigênio	0 a 30 min
Temperatura de 150 °C	
Condição	Tempo de reação
Aquecimento na presença de ar	0 a 10 min
Aquecimento sob fluxo de oxigênio	0 a 5 min
Aquecimento sob fluxo de nitrogênio	0 a 180 min

Na temperatura de 120 °C em presença de ar, os tubos foram retirados em 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 39 e 40 min de

aquecimento. Na temperatura de 120 °C com fluxo de aproximadamente 0,2 litros por minuto (LPM) de oxigênio puro (99,9 %, White Martins), os tubos foram retirados em 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 20, 25 e 30 min de aquecimento. Na temperatura de 120 °C em presença de ar e galato de propila os tubos foram retirados em 0, 5, 10, 15, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 e 105 min de aquecimento. Na temperatura de 150 °C com fluxo de aproximadamente 0,2 LPM de oxigênio puro (99,9 %, White Martins) os tubos foram retirados em 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 e 5 min de aquecimento. Na presença de ar a 150 °C os tubos foram retirados em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 min de aquecimento. Na temperatura de 150 °C com fluxo de aproximadamente 0,2 LPM de nitrogênio puro (99,9 %, White Martins) os tubos foram retirados em 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 e 180 min de aquecimento.

Após o tempo de aquecimento, cada tudo foi rapidamente resfriado em banho de gelo e armazenado a -35 °C até o momento da análise. A Figura 7 apresenta um esquema simplificado do procedimento realizado.

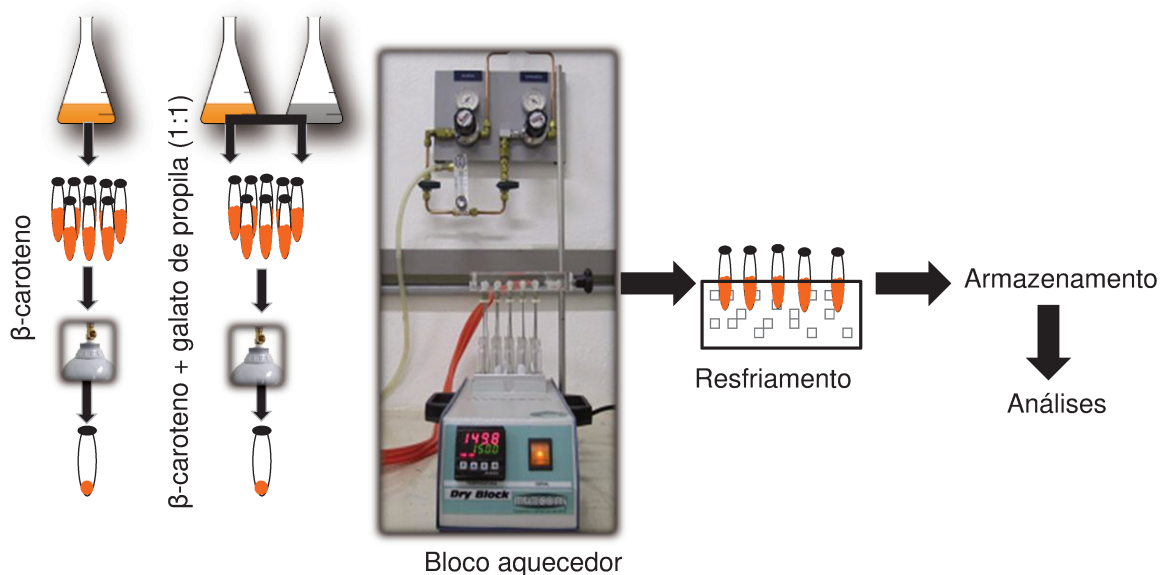


Figura 7. Procedimento simplificado utilizado para avaliar a degradação térmica de  $\beta$ -caroteno sólido.

As análises realizadas após aquecimento em todos os sistemas foram: carotenóides totais por espectrofotometria, carotenóides totais por HPLC-DAD, identificação dos compostos de degradação por HPLC-DAD-MS/MS, determinação da cor realizada em

espectro-colorímetro, capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> e pelo método de desativação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

#### **4.4 Degradação química do β-caroteno: reação induzida com permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>)**

Os apocarotenóides derivados do β-caroteno foram obtidos pela reação química induzida por KMnO<sub>4</sub> em meio líquido, de acordo com as metodologias de Caris-Veyrat et al. (2003) e Rodriguez e Rodriguez-Amaya (2007, 2009), com modificações. O procedimento realizado está esquematizado na Figura 8.

O KMnO<sub>4</sub> foi dissolvido em água e o β-caroteno dissolvido em diclorometano gelado. A reação foi conduzida utilizando a proporção de 2,6 mol equivalente de KMnO<sub>4</sub> para 1 mol equivalente de β-caroteno em frasco (100 mL) com tampa, sob agitação (600 rotações por minuto - rpm), a temperatura ambiente.

Imediatamente após a adição do KMnO<sub>4</sub>, a reação foi monitorada através da retirada de alíquotas de 1 mL em 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 600 min de reação. As amostras foram lavadas 5 vezes com água destilada. Nesta etapa, para facilitar a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 1400 rpm durante 3 min a 16 °C. Posteriormente foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para adsorção da água residual presente. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000 rpm/10 min/16 °C para eliminar possíveis sujidades que ainda poderiam estar presentes, e por fim, foram secos sob fluxo de N<sub>2</sub> e analisados imediatamente.

As análises realizadas após reação química foram: carotenóides totais por HPLC-PDA, identificação dos compostos de degradação por HPLC-PDA-MS/MS, determinação da cor realizada em espectrofotômetro calculando os parâmetros CIELAB utilizando o software CromaLab<sup>®</sup>, determinação da cor realizada em espectrorradiômetro, capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> e pelo método de desativação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

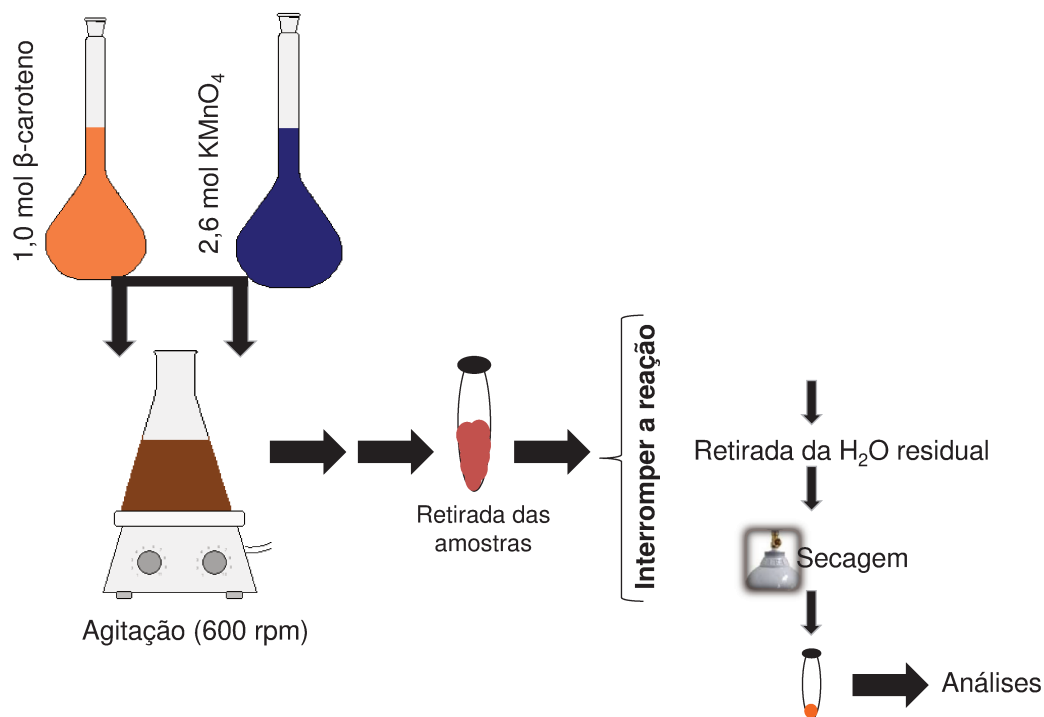


Figura 8. Procedimento simplificado utilizado para a reação química induzida com  $\text{KMnO}_4$ .

#### 4.5 Degradação química do $\beta$ -caroteno: reação induzida com ácido meta-cloro-perbenzóico (MCPBA)

Os epóxidos derivados do  $\beta$ -caroteno foram obtidos através da reação com MCPBA em meio líquido, de acordo com a metodologia de Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007, 2009), com pequenas modificações. O procedimento realizado está esquematizado na figura 9.

A reação foi realizada em diclorometano gelado com 1,5 mol equivalente de MCPBA para 1 mol equivalente de  $\beta$ -caroteno, em frasco (100 mL) com tampa sob agitação (600 rpm) à temperatura ambiente.

Imediatamente após a adição de MCPBA, a reação foi monitorada através da retirada de alíquotas de 1 mL em 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 600 min de reação. Cada amostra foi lavada uma vez com tiosulfato de sódio (20 %) e mais duas vezes com água destilada. Entre estas etapas, para facilitar a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 1400 rpm durante 3 min a 16 °C. Posteriormente, foi adicionada uma solução concentrada de bicarbonato de sódio (9 g/100

mL) e as amostras foram novamente lavadas com água destilada (três vezes) e centrifugados. Em seguida, foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para adsorção da água residual. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm/10 min/16 °C para eliminar possíveis sujidades e por fim, os extratos foram secos sob fluxo de  $\text{N}_2$  e imediatamente analisados.

As análises realizadas após reação química foram: carotenóides totais por HPLC-PDA, identificação dos compostos de degradação por HPLC-PDA-MS/MS, determinação da cor realizada em espectrofotômetro calculando os parâmetros CIELAB utilizando o software Cromalab<sup>®</sup>, determinação da cor realizada em espectrorradiômetro, capacidade antioxidante pelo método ABTS<sup>\*\*</sup> e pelo método de desativação do  $^1\text{O}_2$ .

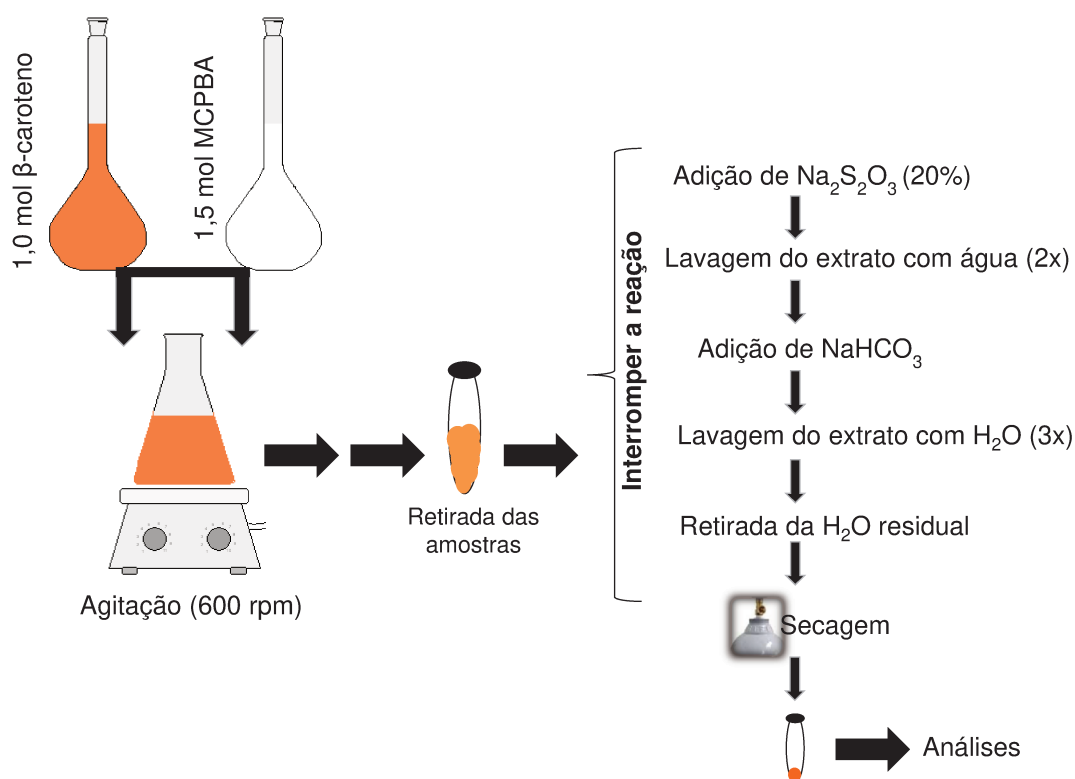


Figura 9. Procedimento simplificado utilizado para a reação química induzida com MCPBA.

#### 4.6 Determinação de carotenóides totais

Todas as amostras foram solubilizadas em éter de petróleo e a absorbância foi medida em espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent, EUA) na faixa de 260 a 600

nm. A concentração total de carotenóides foi calculada através da Lei de Beer (equação 6), utilizando 450 nm como comprimento de onda máximo e coeficiente de absorvidade ( $E_{1\text{cm}}^{\%}$ ) de 2592, referente ao padrão de  $\beta$ -caroteno (Britton, 1995).

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{abs} \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{\%}} \times \text{FD} \quad (\text{Equação 6})$$

onde abs é a absorbância e FD o fator de diluição realizado.

#### 4.7 Identificação dos compostos de degradação por HPLC-DAD-MS/MS

As amostras provenientes dos sistemas de aquecimento e das reações químicas induzidas foram dissolvidas em MTBE e MeOH (1:1) e filtradas em membrana de polietileno (Millipore, EUA) com 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, a quantidade de solvente utilizado em cada amostra analisada foi dependente tempo de degradação submetido.

A identificação dos compostos de degradação foi realizada por HPLC-DAD-MS/MS (Shimadzu, Japão), equipado com sistema de bombeamento quartenário de bombeamento (modelo LC-20AD), desgaseificador *on-line* e sistema de injeção *Rheodyne* de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne LCC, EUA). O equipamento estava acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) (Shimadzu, modelo SPD-M20A, Japão) e espectrômetro de massas (MS) com analisador *ion-trap* Bruker Daltonics (modelo Esquire 4000, Alemanha) com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI), operando no modo positivo. A separação foi realizada em coluna  $\text{C}_{30}$  YMC (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm id.) (Waters, EUA) e fase móvel com gradiente linear de MeOH/MTBE de 95:5 para 70:30 em 30 min, para 50:50 em 20 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 32 °C. Os cromatogramas foram processados a 450 nm, e os espectros adquiridos entre 260 e 600 nm (De Rosso & Mercadante, 2007). As condições de operação do MS foram idênticas às utilizadas por De Rosso & Mercadante (2007).

A identificação dos carotenóides foi baseada nos seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna  $\text{C}_{30}$ , características do espectro no UV-visível ( $\lambda_{\text{max}}$ , estrutura fina e intensidade do pico *cis*), espectro de massas (molécula protonada e fragmentos), comparações com dados disponíveis na literatura e com os padrões 15-*cis*-, 9-*cis*- e 13-

*cis*- $\beta$ -caroteno;  $\beta$ -apo-8'-, 10'- e 12'-carotenal.

A estrutura fina espectral (% III/II) foi determinada traçando uma linha reta no valor mínimo entre os picos de maior comprimento de onda (III) e o pico designado de  $\lambda_{\text{max}}$  (II), e após a medição da altura destes picos realizou-se o cálculo em porcentagem de altura pico III sobre altura do pico II. A intensidade do pico *cis* (%  $A_B/A_{II}$ ) foi determinada a partir da linha de base do espectro medindo a altura do pico de  $\lambda_{\text{max}}$  (II) e a altura da banda de absorção na região conhecida como pico *cis*, cerca de 142 nm abaixo do pico com  $\lambda_{\text{max}}$ , calculando a porcentagem de altura do pico *cis* ( $A_B$ ) sobre pico II ( $A_{II}$ ) (Figura 10).

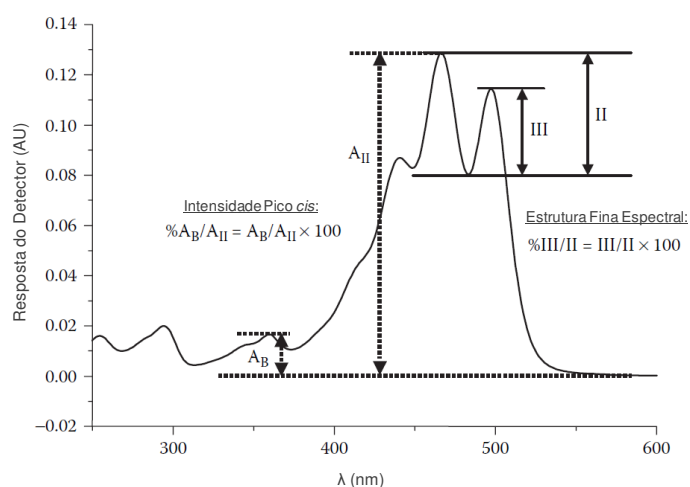


Figura 10. Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico *cis*. Adaptado de Mercadante (2008).

#### 4.8 Quantificação por HPLC-DAD dos carotenóides formados nos sistemas-modelo submetidos ao aquecimento

A quantificação de  $\beta$ -caroteno e dos produtos de degradação nos sistemas submetidos ao aquecimento foi realizada no HPLC Waters conforme descrito no item 4.2.

A quantificação foi realizada utilizando a curva analítica externa de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e os compostos de degradação foram calculados pela mesma curva. A curva foi construída utilizando 9 concentrações diferentes de *all-trans*- $\beta$ -caroteno.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados por parâmetros da curva analítica calculados de acordo com as equações 7 e 8. Onde LD é o limite de detecção,



LQ o limite de quantificação,  $s$  o coeficiente linear da curva e  $S$  o coeficiente angular da curva (Ribani et al., 2004).

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 7})$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 8})$$

#### **4.9 Quantificação por HPLC-DAD dos carotenóides dos sistemas submetidos à reação química com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA**

A quantificação de  $\beta$ -caroteno e dos produtos de degradação durante as reações químicas foi realizada em dois cromatógrafos, uma vez que as análises foram realizadas em laboratórios diferentes:

i) No Laboratório de Química de Alimentos (FEA, UNICAMP) foi utilizado um HPLC Shimadzu onde foi utilizando os parâmetros operacionais descritos no item 4.7. Para isto, uma curva analítica utilizando 7 concentrações diferentes foi realizada seguindo os mesmos parâmetros descritos no item 4.8.

ii) No Laboratório de *Color y Calidad de Alimentos (Universidad de Sevilla)* foi realizada no HPLC (Agilent, EUA) equipado com sistema de bombeamento quartenário (LC-20AD), sistema de injeção eletrônica de 20  $\mu\text{L}$  (Agilent, EUA), desgaseificador *on-line* e detector DAD. A separação dos compostos foi realizada em coluna  $\text{C}_{30}$  YMC (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm id.), utilizando como fase móvel um gradiente linear de MeOH com TEA/MTBE/água de 90:5:5 para 95:5:0 em 15 min, de 95:5:0 para 70:30:0 em 30 min, de 70:30:0 para 50:50:0 em 50 min e finalmente de 50:50:0 para 95:5:5 em 15 min. O fluxo foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna mantida a 29 °C. Os espectros foram adquiridos entre 260 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm. Nesta parte do trabalho, a quantificação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e dos compostos de degradação foi realizada utilizando as áreas cromatográficas fornecidas pelo software do equipamento.

#### 4.10 Método de desativação do radical ABTS<sup>•+</sup>

Para a formação do cátion radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>), adicionou-se solução aquosa de ABTS (7 mM, concentração final) à solução de persulfato de potássio (4,9 mM, concentração final). Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas. Após esse tempo, a absorbância, medida a 734 nm, foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ) com a adição de etanol (Re et al., 1999). Soluções do padrão de referência de trolox, e das amostras estudadas provenientes dos sistemas modelos foram dissolvidas em 1:1 de acetato de etila:etanol.

As medidas das amostras provenientes dos sistemas com aquecimento foram conduzidas espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent, EUA). Em 1,8 mL da solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> foi adicionado 200  $\mu$ L da solução padrão referência de trolox ou amostras teste, seguido de agitação. A reação foi monitorada por meio de leituras de absorbância a 750 nm a cada 5 segundos até completar 15 min da reação.

Os ensaios de desativação do radical ABTS<sup>•+</sup> foram conduzidos utilizando a mesma concentração de carotenóides totais para cada tempo de aquecimento, independente da proporção de produtos de degradação presente, determinado por espectrofotometria e expresso em all-*trans*- $\beta$ -caroteno (conforme item 4.6).

As medidas das amostras provenientes da clivagem oxidativa foram conduzidas em microplacas de 96 poços, onde a composição final foi 270  $\mu$ L da solução etanólica de ABTS<sup>•+</sup> e 30  $\mu$ L de solução padrão referência de trolox ou amostras teste. A leitura da absorbância foi efetuada em um leitor de microplacas Synergy Mx (Biotek, EUA) durante 15 min, sendo realizadas leituras a 750 nm a cada 10 segundos para acompanhar a cinética da reação.

Em todas as análises realizadas, foram calculados a % de inibição e os resultados foram expressos como TEAC, o qual foi obtido pela razão entre os coeficientes angulares da curva da amostra teste e da curva do padrão de referência de trolox. Essas curvas foram construídas a partir da porcentagem de inibição frente ao radical (equação 9) em função da concentração final do padrão referência de trolox (2,5 a 20  $\mu$ M) e das amostras teste (1 a 80  $\mu$ M).

$$\% \text{ de inibição do radical} = \left( \frac{\text{abs}_{\text{inicial}} - \text{abs}_{\text{final}}}{\text{abs}_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde  $abs_{inicial}$  é a absorbância do radical antes da adição de amostra e  $abs_{final}$  é a absorbância do radical após 15 min da adição de amostra.

#### 4.11 Método de desativação do oxigênio singlete ( $^1O_2$ )

O procedimento descrito por Montenegro et al. (2004), com algumas modificações foi utilizado para a determinação do efeito protetor das amostras provenientes dos sistemas com aquecimento e da clivagem oxidativa frente ao  $^1O_2$ .

As reações foram realizadas utilizando etanol como meio de reação, solução de 1 g/L de dimetil antraceno (DMA) como actinômetro e solução de azul de metileno (5  $\mu$ M) como sensibilizador (MB), com agitação moderada, atmosfera de ar e temperatura de  $25 \pm 1$  °C. A uma cubeta de 1,5 mL, foram adicionados 1180  $\mu$ L de azul de metileno, 20  $\mu$ L DMA e 50  $\mu$ L amostra ou etanol:acetato de etila. Os ensaios foram conduzidos utilizando a mesma concentração de carotenóides totais para cada tempo de aquecimento, independente da proporção de produtos de degradação presente, determinado por espectrofotometria e expresso em all-*trans*- $\beta$ -caroteno (conforme item 4.6).

O sistema foi iluminado com uma lâmpada de filamento de 150 W acoplada a um conjunto de filtros laranja e vermelho, permitindo a passagem de luz somente em comprimento de onda maior que 570 nm, de forma a excitar somente o sensibilizador. O sistema foi monitorado por 5 min através da medida do decaimento da intensidade (UA) dos espectros de absorção da solução a 375 nm em um sistema integrado com um espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent, EUA). Os dados de decaimento da intensidade de absorção do actinômetro foram ajustados à reação cinética de primeira ordem (Equação 10), sendo o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) calculado a partir dos resultados obtidos no ajuste (Equação 11). O efeito protetor proporcionado pelas amostras, dissolvidas em acetato de etila:etanol (1:1), ao actinômetro (DMA) foi calculado através da equação 12.

$$Y = Y_{\infty} + A \cdot \exp^{(-k \cdot x)} \quad (\text{Equação 10})$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Equação 11})$$

$$\% \text{proteção} = \frac{k_{obs}^{DMA} - k_{obs}^{DMA+CAR}}{k_{obs}^{DMA}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Onde  $k_{obs}^{DMA}$  é constante de velocidade de degradação do DMA e  $k_{obs}^{DMA+CAR}$  é a constante de velocidade de degradação do DMA na presença de carotenóides (mistura de  $\beta$ -caroteno com produtos de degradação).

A concentração de antioxidante necessária para que se obtenha 50 % de proteção ( $IC_{50}$ ), foi calculada para cada tempo da reação química de clivagem oxidativa (0 a 60 min), utilizando os parâmetros obtidos com os ajustes lineares realizados para as curvas % proteção *versus* concentração de carotenóides.

#### 4.12 Determinação dos parâmetros de cor

Nos experimentos dos sistemas-modelo com aquecimento, a análise da cor foi realizada em espectro-colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab, EUA) equipado com iluminante  $D_{65}$  e ângulo do observador de  $10^\circ$ , leitura no modo transmitância, utilizando a escala CIELAB. A partir dos valores de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas de cor), os parâmetros  $C^*_{ab}$  (croma ou saturação de cor),  $h_{ab}$  (ângulo de tonalidade cromática) e  $\Delta E^*$  (diferença global de cor) foram calculadas utilizando as Equações 13 a 16.

$$C^*_{ab} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{equação 13})$$

$$h_{ab} = \arctan (b^*/a^*) \quad \text{quando } a^* > 0 \quad (\text{equação 14})$$

$$h_{ab} = 180 + \arctan (b^*/a^*) \quad \text{quando } a^* < 0 \quad (\text{equação 15})$$

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{equação 16})$$

Nos experimentos com reações induzidas quimicamente, as medidas instrumentais de cor também foram realizadas com padrão de iluminante  $D_{65}$  e ângulo do observador de  $10^\circ$ , em:

i) espectrofotômetro HP8452 UV-visível com arranjo de diodos (Agilent, EUA), registrando o espectro UV-visível ( $\Delta\lambda = 1$  nm) entre 380 e 780 nm. Os parâmetros CIELAB foram determinados utilizando o software CromaLab<sup>®</sup> (Heredia et al., 2004), seguindo as recomendações da Commission Internationale de L'Eclairage (CIE, 2004).

ii) espectrorradiômetro (Instrument systems, CAS140-B, EUA) equipado com lâmpada externa incandescente, sonda telescópica TOP 100, Zoom Tamron SP-23A e software IS-SpecWin version 1.8.1.6. O espectro foi registrado entre 380 e 770 nm ( $\Delta\lambda = 1$  nm), obtendo-se diretamente os parâmetros colorimétricos correspondentes ao espaço uniforme CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  e  $h_{ab}$ ).

#### 4.13 Análise dos dados

Os cálculos cinéticos na análise de desativação do  $^1O_2$ , e o teste de Scheffe (com nível de significância de 95 %), com a finalidade de comparar os valores de TEAC e proteção contra o  $^1O_2$  entre os tempos de aquecimento em cada sistema-modelo foram realizadas no software Origin 8.0. A análise de regressão entre os parâmetros de cor e a concentração de carotenóides foi realizada no Excel 2010.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cristalização de $\beta$ -caroteno

De acordo com Oualja, Perrin & Martin (1995), o período de indução da reação de degradação é fortemente dependente do grau de pureza do padrão utilizado. Além disso, a oxidação do  $\beta$ -caroteno é muito sensível às impurezas presentes no próprio padrão. Dessa forma, para aumentar o grau de pureza do padrão sintético de  $\beta$ -caroteno foi realizado a cristalização.

Através dos cromatogramas obtidos por HPLC do padrão sintético de  $\beta$ -caroteno antes e depois da cristalização (Figura 11) verificou-se que após a segunda cristalização, a pureza do *all-trans*- $\beta$ -caroteno (pico 13) passou de 96,5 % para 98,1 %, com concomitante eliminação dos compostos representados pelos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12 e 14 e redução da intensidade dos picos 7, 8 e 9. As características cromatográficas e do espectro UV-visível destes picos estão representadas na Tabela 2.

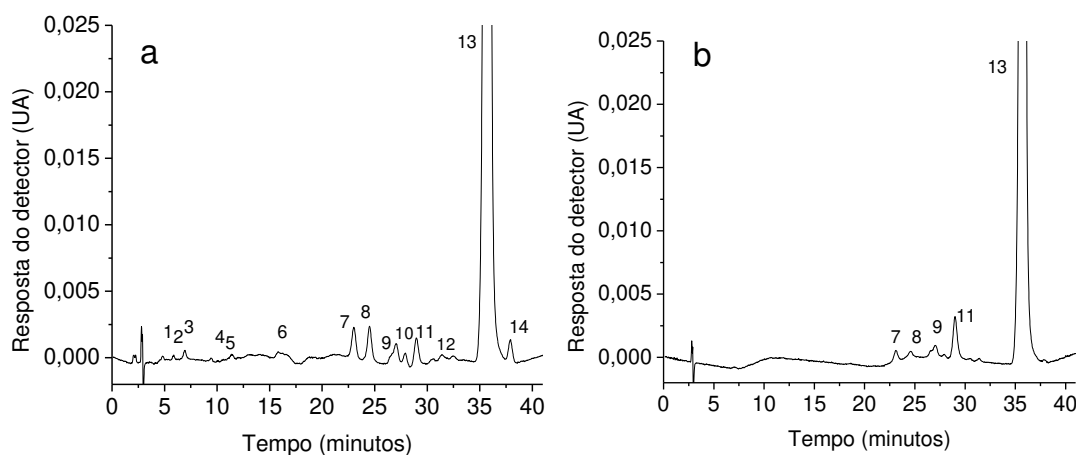


Figura 11. Cromatogramas, processados a 450 nm, obtidos por HPLC-DAD, do padrão sintético de  $\beta$ -caroteno sem purificar (a) e após duas cristalizações (b). As condições cromatográficas estão descritas no item 4.2 do material e métodos. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Características cromatográficas e espectrofotométricas, e composição relativa (%), obtidas por HPLC-DAD, dos compostos presentes no padrão sintético de  $\beta$ -caroteno sem purificar, cristalizado e recristalizado.

Pico <sup>a</sup>	Identificação	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$\lambda_{max}$ (nm) <sup>c</sup>	Porcentagem de Área		
				sem purificar	cristalizado 1x	cristalizado 2x
1	não identificado	4,8	454	0,02	0	0
2	não identificado	5,8	450	0,04	0	0
3	não identificado	6,9	380, 422	0,10	0	0
4	não identificado	9,4	440, 450	0,03	0	0
5	não identificado	11,3	425, 444	0,08	0	0
6	não identificado	15,8	428, 454	0,11	0	0
7	não identificado	23,0	425, 450, 478	0,58	0,37	0,31
8	não identificado	24,5	415, 445, 473	0,64	0,12	0,17
9	não identificado	27,0	405, 427, 453	0,50	0,55	0,11
10	não identificado	27,9	438, 465	0,26	0,00	0
11	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	28,9	337, 420, 444, 470	0,56	2,53	1,26
12	não identificado	31,4	423, 445, 472	0,11	0,04	0
13	<i>all-trans</i> - $\beta$ -caroteno	35,7	423, 451, 478	96,50	96,28	98,15
14	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	37,9	447, 474	0,47	0,11	0

<sup>a</sup> Picos numerados de acordo com a Figura 11.

<sup>b</sup> Tempo de retenção na coluna C<sub>30</sub>.

<sup>c</sup> Gradiente linear de MeOH/MTBE.

A microscopia óptica do padrão cristalizado e recristalizado está apresentada na Figura 12. Os cristais apresentaram formas geométricas irregulares, predominando as formas alongadas e prismáticas.

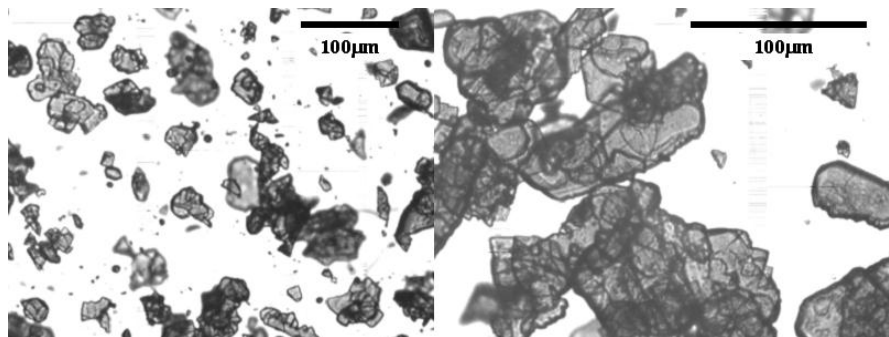


Figura 12. Microscopia óptica de  $\beta$ -caroteno, cristalizado 2 vezes. Lentes objetivas de 12,5 (esquerda) e 25 x (direita), ambas com optular de 1,25 x. Barras: 100  $\mu$ m.

## 5.2 Degradação térmica de $\beta$ -caroteno

### 5.2.1 Identificação dos carotenóides formados durante degradação térmica

As características cromatográficas e espectroscópicas dos 14 carotenóides identificados nos sistemas-modelo avaliados encontram-se na Tabela 3. A Figura 13 apresenta os cromatogramas obtidos em diferentes estágios de aquecimento do sistema-modelo a 150 °C em presença de ar, uma das condições em que apenas um dos 14 carotenóides identificados não foi detectado, o 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 11). A Tabela 4 apresenta a ocorrência dos compostos detectados em cada um dos seis diferentes sistemas-modelo estudados.



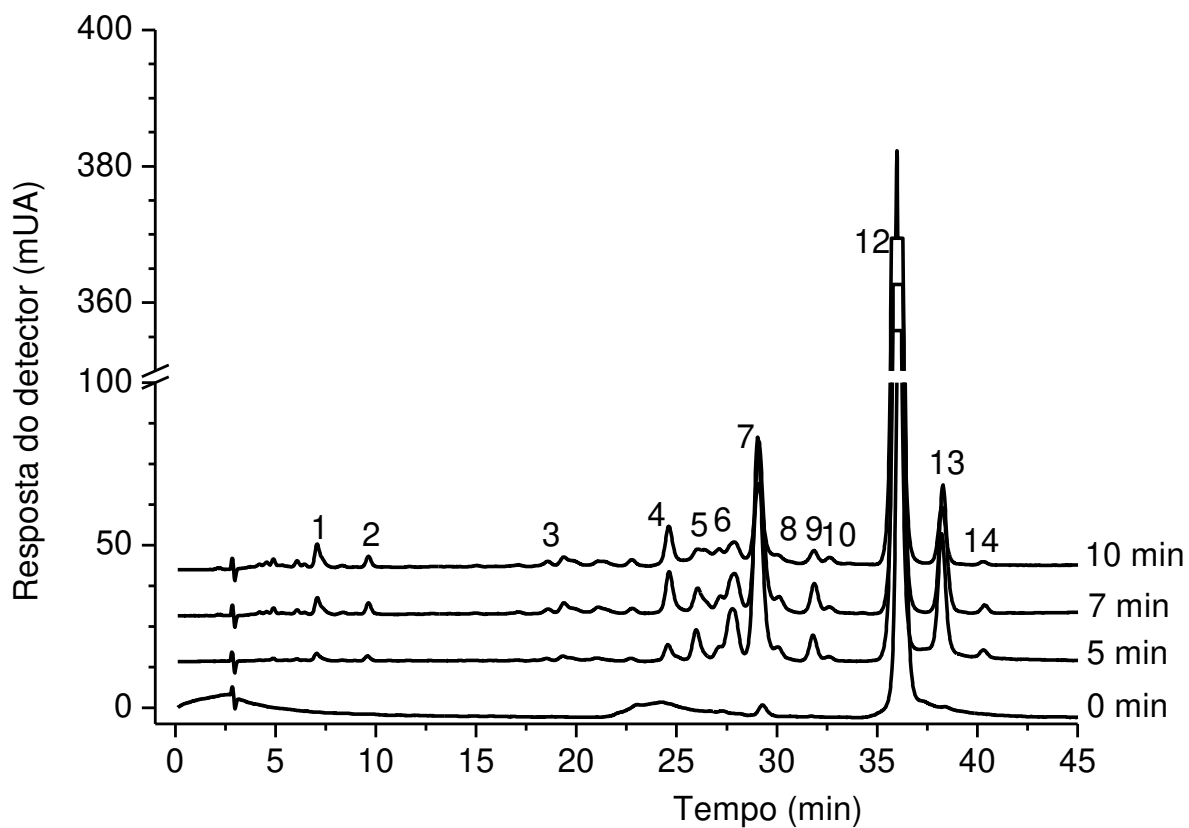


Figura 13. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 5, 7 e 10 minutos do  $\beta$ -caroteno aquecido a 150 °C em presença de ar. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7 do material e métodos. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados nos sistemas-modelo de  $\beta$ -caroteno submetidos ao aquecimento a 120 e 150 °C.

Pico	Carotenóide	$\Delta t_R$ (min) <sup>a</sup>	$\lambda_{max}$ (nm) <sup>b</sup>	% III/II	% A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentação de íons MS/MS (m/z)
1	$\beta$ -apo-12'-carotenal <sup>c</sup>	6,8-7,1	425	0	0	nd	nd
2	$\beta$ -apo-10'-carotenal	9,0-9,6	443	0	0	377	359[M+H-18] <sup>+</sup>
3	$\beta$ -apo-8'-carotenal	18,5-18,6	453-460	0	0	417	399[M+H-18] <sup>+</sup> , 361[M+H-56] <sup>+</sup>
4	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	23,3-24,6	325, 420, 444, 472	56	0	553	535[M+H-18] <sup>+</sup>
5	<i>cis</i> -epóxi- $\beta$ -caroteno + diepóxi- $\beta$ -caroteno	25,5-26,3	405, 427, 453	30	5	553/ 569	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 205 551[M+H-18] <sup>+</sup> , 205
6	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	26,6-27,9	336, 410, 440, 465	5	57	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
7	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	27,7-29,1	336, 420, 444, 469	8	45	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
8	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	30,0-30,8	335, 420, 442, 467	3	31	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
9	9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	31,5-31,8	335, 415, 438, 463	13	20	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
10	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	31,0-32,6	409, 431, 456	63	0	553	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 496[M+H-58] <sup>+</sup>
11	13,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	32,4-32,5	336, 415, 437, 462	8	14	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
12	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	34,5 - 36,2	425, 452, 477	27	0	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
13	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	36,5-38,3	340, 420, 445, 473	25	8	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
14	9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	38,4-40,3	337, 420, 448, 475	38	6	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Variação do tempo de retenção em coluna C<sub>30</sub> utilizando gradiente linear de MeOH com 0,1% de TEA em MTBE.

<sup>b</sup> Gradiente linear de MeOH/MTBE.

<sup>c</sup> tentativa de identificação

nd: não detectado.

Tabela 4. Compostos detectados durante a degradação de  $\beta$ -caroteno sólido aquecido a 120 e 150 °C em presença de ar com e sem galato de propila, fluxo de oxigênio ou de nitrogênio.

Pico	Carotenóide	120 °C ar	120 °C oxigênio	120 °C ar + galato de propila	150 °C ar	150 °C oxigênio	150 °C nitrogênio
1	$\beta$ -apo-12'-carotenal	X	X	X	X	X	X
2	$\beta$ -apo-10'-carotenal	X	X	X	X	X	X
3	$\beta$ -apo-8'-carotenal	O	O	O	X	O	O
4	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	X	X	X	X	X	X
5	mistura de <i>cis</i> -epóxi- $\beta$ -caroteno + diepóxi- $\beta$ -caroteno	X	X	X	X	X	X
6	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	X	O	X	X	X	X
7	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	X	X	X	X	X	X
8	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	O	O	X	X	X	X
9	9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	O	O	O	X	X	X
10	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	X	X	X	X	X	X
11	13,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	O	O	O	O	O	X
12	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	X	X	X	X	X	X
13	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	X	O	X	X	X	X
14	9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	O	O	O	X	X	X

X: detectado.

O: não detectado.

O *all-trans*- $\beta$ -caroteno (pico 12), ponto de partida para o aquecimento, apresentou tempo de eluição de 34,5 a 36,2 min,  $\lambda_{\max}$  425, 452, 477 nm e estrutura fina de 27 %. O espectro de massas apresentou molécula protonada com  $m/z$  537, e fragmentos com perda de 92 u (característico da eliminação de tolueno) e de 137 u (perda de um anel  $\beta$ ).

A identificação dos isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno foi baseada na comparação com padrões, na observação dos valores de  $\lambda_{\max}$  ligeiramente menores (450 a 437 nm), na redução do grau da estrutura fina quando comparados ao isômero *all-trans*, além da presença do pico *cis* a cerca 336 nm, cuja intensidade (%  $A_B/A_{II}$ ) aumentou à medida em que a isomerização se aproximou do centro da molécula. Vale salientar que a reação de isomerização ocorre preferencialmente em determinadas regiões da molécula, uma vez que alguns locais são impedidos estericamente. As posições mais estáveis estão nos carbonos 9-, 13- e 15- (Zechmeister, 1944). Além disso, também foram considerados os dados da literatura que descreveram as características dos isômeros *cis* derivados do  $\beta$ -caroteno (Brunner, 1997; Lacker, Strohschein & Albert; 1999; De Rosso & Mercadante, 2007; Faria et al., 2009) e a ordem de eluição em coluna  $C_{30}$ .

O isômero 15-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 6) foi encontrado durante o aquecimento a 120 °C em presença de ar, presença de ar com galato de propila e em todas as condições experimentais a 150 °C. Este isômero apresentou deslocamento hipsocrômico de 10 nm em relação ao *all-trans*- $\beta$ -caroteno,  $\lambda_{\max}$  336, 410, 440, 465 nm, intensidade do pico *cis* de 57 % e tempo de retenção de 26,6 a 27,9 min. Foi o primeiro isômero *cis*- $\beta$ -caroteno a eluir na coluna  $C_{30}$  devido à sua conformação espacial.

O isômero 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 7) foi o único isômero *cis* encontrado em todas as condições experimentais, apresentando deslocamento hipsocrômico de aproximadamente 6 nm em comparação ao *all-trans*- $\beta$ -caroteno,  $\lambda_{\max}$  336, 420, 444, 469 nm, intensidade do pico *cis* de 45 % e tempo de retenção de 27,7 a 29,1 min.

O isômero 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 13) eluiu após o *all-trans*- $\beta$ -caroteno e apresentou tempo de retenção entre 36,5 a 38,3 min, menor intensidade do pico *cis* (8 %), em relação aos outros mono-*cis*, e  $\lambda_{\max}$  de 340, 420, 445, 473 nm. O sistema aquecido à 120 °C em presença de oxigênio foi a única condição que esse isômero só não foi detectado.

Brunner (1997) estudou a formação de di-*cis*-isômeros de  $\beta$ -caroteno a partir do 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, e elucidou as estruturas utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). Os deslocamentos hipsocrômicos foram de 12, 14 e 14 nm, para 9,15-di-*cis*, 9,13'-di-*cis* e

9,13-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, respectivamente, em relação ao all-*trans*- $\beta$ -caroteno. A ordem de eluição em coluna C<sub>30</sub> foi 9,15-di-*cis*, 9,13'-di-*cis* e 9,13-di-*cis*- $\beta$ -caroteno. Strohschein, Pursch & Albert (1999) também elucidaram a estrutura dos isômeros 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno e 9,13-di-*cis*- $\beta$ -caroteno por HPLC-RMN. Entretanto, as características dos espectros UV-visível não foram apresentadas e a separação foi realizada com gradiente de acetona com a seguinte ordem de eluição em coluna C<sub>30</sub>: 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, all-*trans*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno.

Qiu, Chen & Li (2008, 2009) reportaram as características dos espectros UV-visível de três isômeros *cis* e quatro di-*cis*-isômeros de  $\beta$ -caroteno utilizando além de HPLC-DAD com coluna C<sub>30</sub>, cromatografia de permeação em gel e teoria funcional da densidade. Os isômeros apresentaram a seguinte ordem de eluição em coluna C<sub>30</sub>: 15-*cis*, 13-*cis*-, 9,15-di-*cis*, 9,13-di-*cis*, all-*trans*, 13,15-di-*cis*, 9-*cis* e 9,13'-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, e o deslocamento hipsocrômico em relação ao all-*trans*- $\beta$ -caroteno variou de 14 a 16 nm.

Nas condições avaliadas, quatro di-*cis*-isômeros foram tentativamente identificados. O pico 8 foi identificado como 9,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, considerando o deslocamento hipsocrômico de 10 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  de 335, 442, 442, 467 nm, menor intensidade do pico *cis* que os isômeros 13- e 15-*cis*- $\beta$ -caroteno. O 9,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno foi encontrado a 120 °C em presença de ar com galato de propila, 150 °C com presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio.

O isômero 9,13'-di-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 9) foi encontrado somente nas condições experimentais a 150 °C, e foi identificado devido à intensidade do pico *cis* de 20 %, deslocamento hipsocrômico de 14 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  de 335, 415, 438, 463 nm, tempo de retenção entre 31,5 a 31,8 min e ordem de eluição e  $\lambda_{\text{max}}$  compatível com Brunner (1997).

O pico 11, caracterizado como 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, foi identificado somente no sistema a 150 °C com fluxo de nitrogênio, apresentando intensidade do pico *cis* de 20 %, deslocamento hipsocrômico de aproximadamente 15 nm em comparação ao all-*trans*- $\beta$ -caroteno,  $\lambda_{\text{max}}$  de 336, 415, 437, 462 nm e tempo de retenção entre 32,4 a 32,5 min. A respeito da ordem de eluição, no presente trabalho o 13,15-di-*cis* eluiu antes do all-*trans*- $\beta$ -caroteno, enquanto que Qiu, Chen & Li, (2009) afirmaram que esse composto eluiu depois da forma all-*trans*; porém estes autores não empregaram RMN para confirmar a identidade dos carotenóides.

O último pico a eluir, 9,13-di-*cis*- $\beta$ -caroteno (pico 14), foi encontrado em todos os experimentos com aquecimento a 150 °C, apresentou tempo de retenção entre 38,4 e

40,3 min,  $\lambda_{\max}$  de 337, 420, 448, 475 nm (perda de aproximadamente 4 nm quando comparado ao all-*trans*- $\beta$ -caroteno) e pequena intensidade do pico *cis* (6 %).

Os epóxidos (picos 4, 5 e 10) foram detectados em todas as condições experimentais a 120 e 150°C. O pico 4 foi identificado como 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, pois apresentou espectro de massas com molécula protonada a  $m/z$  553 e fragmentos a  $m/z$  535 (perda de água) e  $m/z$  205 (fragmento característico da presença do grupo epóxido em anel  $\beta$ ). Este epóxido apresentou elevada estrutura fina, ausência de pico *cis* e deslocamento hipsocrômico de 6 nm, característico de 5,6-epóxido quando comparado ao  $\lambda_{\max}$  de all-*trans*- $\beta$ -caroteno.

O pico 5 apresentou características de uma mistura de mono e diepóxidos. Essa mistura foi tentativamente identificada como *cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, pois o espectro de massas mostrou a presença de duas moléculas protonadas, a  $m/z$  553 e  $m/z$  569, ambas com fragmentações características de perda de água e da presença de grupo epóxido ( $m/z$  205).

O pico 10 foi tentativamente identificado como 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, pois apresentou elevado valor de estrutura fina (63 %), molécula protonada a  $m/z$  553 e fragmento a  $m/z$  535 (perda de água), deslocamento hipsocrômico de cerca de 20 nm quando comparado ao  $\lambda_{\max}$  de all-*trans*- $\beta$ -caroteno, característica típica do 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno. Além disso, o pico 10 apresentou pequeno pico *cis*, e ordem de eluição diferente do composto 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno relatado por De Rosso & Mercadante (2007), Zepka & Mercadante (2009) e Bechoff et al. (2010). Considerando estes fatos, o pico 10 foi tentativamente identificado como isômero 9-*cis* do 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno.

Embora não tenha sido possível identificar  $\beta$ -apo-12'-carotenal (pico 1) por espectrometria de massas (molécula protonada a  $m/z$  351 não foi detectada), a identificação desse carotenóide foi confirmada pela comparação idêntica com o padrão. O  $\beta$ -apo-12'-carotenal foi encontrado em todas as condições de aquecimento, apresentando tempo de retenção de 6,8 a 7,1 min e  $\lambda_{\max}$  em 425 nm.

O  $\beta$ -apo-10'-carotenal (pico 2) também foi encontrado em todos os experimentos. Sua identificação foi confirmada por MS/MS no sistema a 150 °C em presença de ar por meio da molécula protonada a  $m/z$  377, com fragmento a  $m/z$  359 (perda de uma molécula de água). Entretanto, nas outras condições de aquecimento, o composto foi confirmado apenas pelas características cromatográficas e do espectro UV-visível idênticas às do padrão autêntico (tempo de retenção de 9,0 a 9,6 min e  $\lambda_{\max}$  443 nm).

O  $\beta$ -apo-8'-carotenal (pico 3) foi encontrado somente no sistema a 150 °C na presença de ar, e a identidade foi confirmada pela molécula protonada a  $m/z$  417, com fragmentos a  $m/z$  399 (perda de molécula de água) e  $m/z$  a 361 (perda de xileno). Além disso, seu tempo de retenção ficou entre 18,5 e 18,6 min e  $\lambda_{\max}$  entre 453 e 460 nm, com características idênticas ao padrão autêntico.

A degradação de  $\beta$ -caroteno em temperaturas acima de 100 °C foi estudada por vários pesquisadores (Chandler & Schwartz, 1988; Chen, Chen & Chien, 1994; Chen & Huang, 1998, Henry, Catignani & Schwartz, 1998; Liu & Chen, 1998; Aman; Schieber & Carle, 2005; Qiu, Chen & Li, 2009) que observaram a formação de pelo menos um dos mono-*cis* e di-*cis* isômeros detectados no presente trabalho. Os compostos de oxidação, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-10'-carotenal e  $\beta$ -apo-12'-carotenal, também foram detectados por Marty & Berset (1986, 1990) e Berset & Marty (1992) em  $\beta$ -caroteno submetido a alta temperatura e pressão. Porém, o  $\beta$ -apo-8'-carotenal e 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno foram detectados somente no presente estudo.

Trabalhos a respeito da degradação de outros carotenóides também relataram a formação de isômeros e de produtos de oxidação. Por exemplo, Kanasawud & Crouzet (1990) isolaram cinco isômeros *cis* de licopeno após 3 horas de reação em presença de oxigênio a 97 °C. Zepka & Mercadante (2009) observaram a formação de *cis*-luteína, anteraxantina, mutatoxantina, zeaxantina, auroxantina, 5,6-epóxi- $\beta$ -criptoxantina, 9-*cis*- $\beta$ -criptoxantina e/ou 9'-*cis*- $\beta$ -criptoxantina, 13-*cis*- $\beta$ -criptoxantina e/ou 13'-*cis*- $\beta$ -criptoxantina, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 12'-apo- $\beta$ -carotenal em sistemas-modelo simuladores de suco de caju (constituídos por carotenóides em meio aquoso acidificado) aquecidos a 60 e 90 °C. Entre estes, os compostos 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 12'-apo- $\beta$ -carotenal também foram encontrados nas condições de aquecimento a 120 e 150°C estudadas neste trabalho.

A extrusão de  $\beta$ -caroteno (181 a 186 °C), na presença de amido e adição de diferentes concentrações de antioxidantes (100 ppm de butil-hidroxi-anisol - BHA, 250 ppm do extrato de alecrim, 500 ppm do extrato de alecrim, 500 ppm de  $\alpha$ -tocoferol, e 50 ppm de butil-hidroxi-tolueno - BHT), apresentou menor quantidade de isômeros e maior formação de compostos com baixo peso molecular nas condições controle (sem presença de antioxidante) e na presença de BHA (Berset & Marty, 1992).

O  $\beta$ -caroteno em suspensão aquosa aquecido a 100 °C formou epóxi- $\beta$ -caroteno, diepóxi- $\beta$ -caroteno, enquanto mutacromo e aurocromo foram detectados somente após duas horas de aquecimento. Já a quantidade de 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno foi constante durante todo o período de aquecimento, as quantidades de outros compostos não voláteis aumentaram com o aumento do tempo de aquecimento (Berset & Marty, 1992).

Os apocarotenóides  $\beta$ -apo-14' e  $\beta$ -apo-15-carotenal relatados nos trabalhos de Marty & Berset (1986, 1990), Berset & Marty (1992), Chen, Chen & Chien (1994), Brunner, (1997), Liu & Chen (1998), Chen & Huang (1998) e Henry et al. (2000) não foram detectados nas condições experimentais realizadas no presente estudo.

Em geral, o aquecimento na presença de ar propiciou a formação de epóxidos e apocarotenóides. Interessantemente, na presença de fluxo de oxigênio não foi detectado a formação de  $\beta$ -apo-8'-carotenal, o que possivelmente, está relacionada com a atuação do oxigênio como catalisador e, assim, este composto deve ter sido formado, porém rapidamente transformado em produtos secundários. Em contrapartida, foi possível detectar maior diversidade de isômeros (mono e di-*cis*- $\beta$ -caroteno) com fluxo de nitrogênio devido a menor velocidade da reação de degradação (Tabela 4).

### 5.2.2. Influência do aquecimento no conteúdo de carotenóides totais

A Figura 14 apresenta a variação do conteúdo relativo ( $C/C_0$ ) de carotenóides totais ao longo do aquecimento a 120 °C. O tempo de aquecimento monitorados nos sistemas foi até que o all-*trans*- $\beta$ -caroteno atingisse uma degradação superior a 75 %, o que ocorreu em diferentes tempos, sendo 30 min para o sistema sob fluxo de oxigênio, 40 min em presença de ar e 105 min em presença de ar e galato de propila. Em todos os tempos de aquecimento o  $\lambda_{\max}$  permaneceu em 450 nm. A presença do antioxidante não interferiu na análise de carotenóides totais, uma vez que o  $\lambda_{\max}$  do galato de propila em solução foi de 269 nm. Com o aumento do tempo de aquecimento, o espectro UV-visível de carotenóides totais apresentou diminuição da estrutura fina e a perda da definição característica de all-*trans*- $\beta$ -caroteno devido à formação de isômeros *cis* (Figura 15).



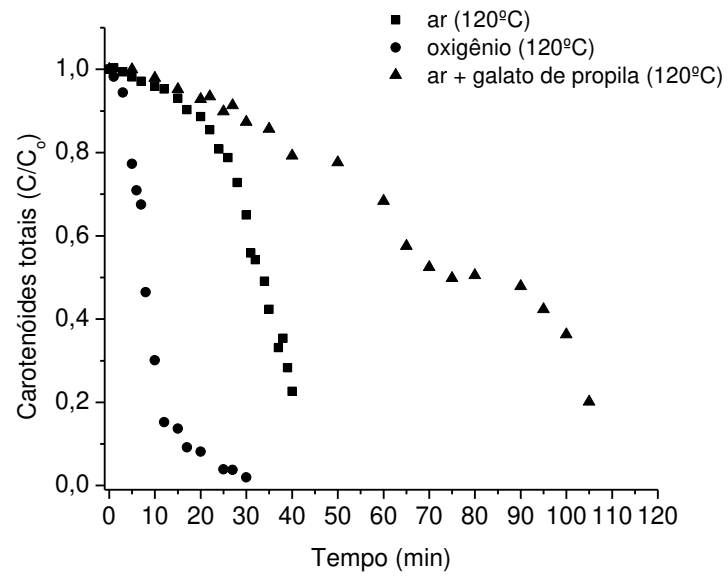


Figura 14. Degradação de carotenóides totais a 120 °C, na presença de ar com e sem galato de propila e sob fluxo de oxigênio.

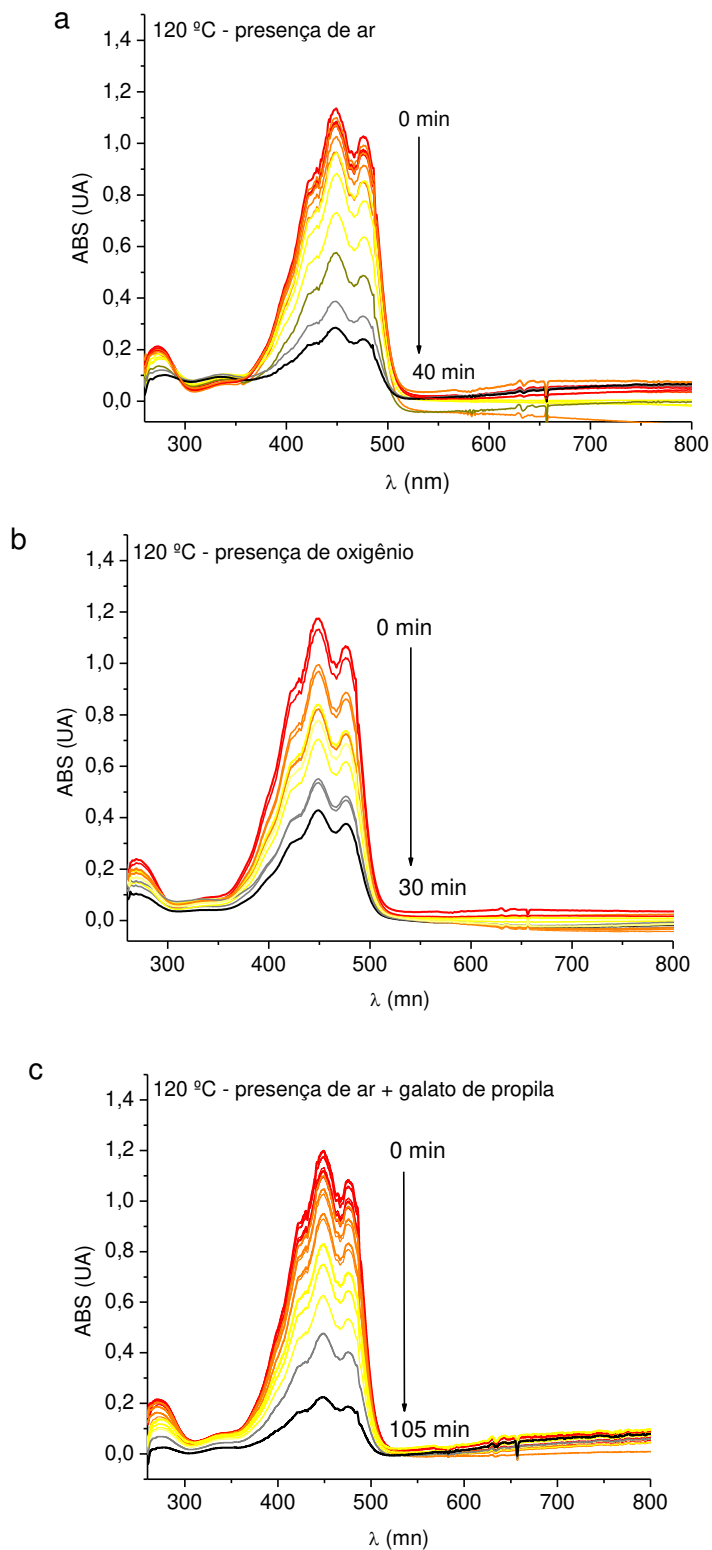


Figura 15. Espectros UV-visível do *all-trans*- $\beta$ -caroteno submetido ao aquecimento a 120 °C, em presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e presença de ar com galato de propila (c).

O decaimento das curvas presentes na Figura 14 indicou reação de auto-catálise, favorecida com a presença de oxigênio no sistema. No tempo de 30 min, a degradação do  $\beta$ -caroteno foi de 98 % no sistema com fluxo de oxigênio, 31 % no sistema em presença de ar e de 13 % na presença de ar com galato de propila. Essa diminuição da degradação do  $\beta$ -caroteno ocorreu, possivelmente, porque o galato de propila (Figura 16) atuou na desativação de espécies reativas derivadas do  $\beta$ -caroteno através da doação de átomos de hidrogênio, o que retardou a reação de oxidação (Damodaran, Parkin & Fennema, 2010).

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos são BHA, BHT, *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila. O galato de propila foi escolhido entre esses antioxidantes sintéticos por apresentar o maior ponto de fusão entre eles. Nenhum relato foi encontrado sobre a utilização de galato de propila em sistemas-modelo com carotenóides. Hamama & Nawar (1991) estudaram a degradação térmica de padrões de galato de propila, TBHQ, BHA e BHT. Neste estudo, 40 % do total inicial de galato de propila e BHT foram mantidos após 60 min de aquecimento a 185 °C enquanto TBHQ e BHA apresentaram maior degradação.

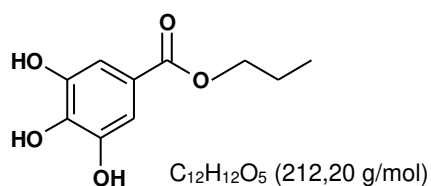


Figura 16. Estrutura química do galato de propila.

A Figura 17 exibe a degradação dos carotenóides totais a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio. Uma degradação superior a 75 % foi observada quando  $\beta$ -caroteno foi aquecido em presença de ar por 10 min e com fluxo de oxigênio por 4 min. O formato da curva cinética indicou mais uma vez auto-catálise, favorecida com o fluxo de oxigênio. Em 3 min de aquecimento foi observado uma degradação de 55 % no sistema com fluxo de oxigênio e de 11 % na presença de ar. Por outro lado, no sistema com fluxo de nitrogênio, a degradação de  $\beta$ -caroteno atingiu apenas 33 % em 60 min de aquecimento.

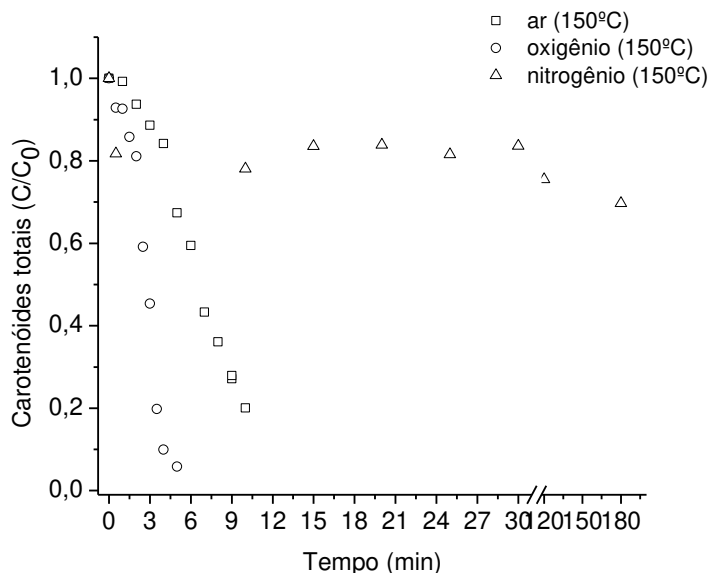


Figura 17. Degradação de carotenóides totais a 150 °C, em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio.

Henry et al. (2000) estudando a reação de oxidação em sistema-modelo aquoso com *trans*-carotenóides em temperatura ambiente, demonstraram que na presença de nitrogênio ocorreu pequena degradação de *all-trans*-carotenóides durante o monitoramento por 7 horas. Por outro lado, na presença de ozônio, o *all-trans*- $\beta$ -caroteno apresentou degradação três vezes mais rápida do que na presença de oxigênio. No entanto, na condição com nitrogênio os autores não fizeram essa comparação.

No sistema-modelo com fluxo de nitrogênio a degradação de  $\beta$ -caroteno foi cerca de 8 vezes mais lenta quando comparada com o sistema com fluxo de oxigênio. Nos sistemas a 150 °C, observou-se que, independente do tempo de aquecimento, o  $\lambda_{max}$  permaneceu em 450 nm, apesar de ocorrer degradação do  $\beta$ -caroteno e formação de outros compostos, principalmente isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno (Figura 18), assim como também ocorreu nos sistemas aquecidos à 120 °C. A estrutura fina diminuiu com o tempo de aquecimento, chegando a valores próximos a zero. Em contrapartida, o pico *cis* aumentou com o tempo de aquecimento, indicando a formação de isômeros *cis*. Esse aumento foi mais acentuado na condição a 150 °C com fluxo de nitrogênio. Em todos os sistemas a 120 °C e 150 °C não foi observado deslocamento batocrômico, o que poderia indicar a polimerização, como foi relatado no trabalho de Qiu, Chen & Li (2009).

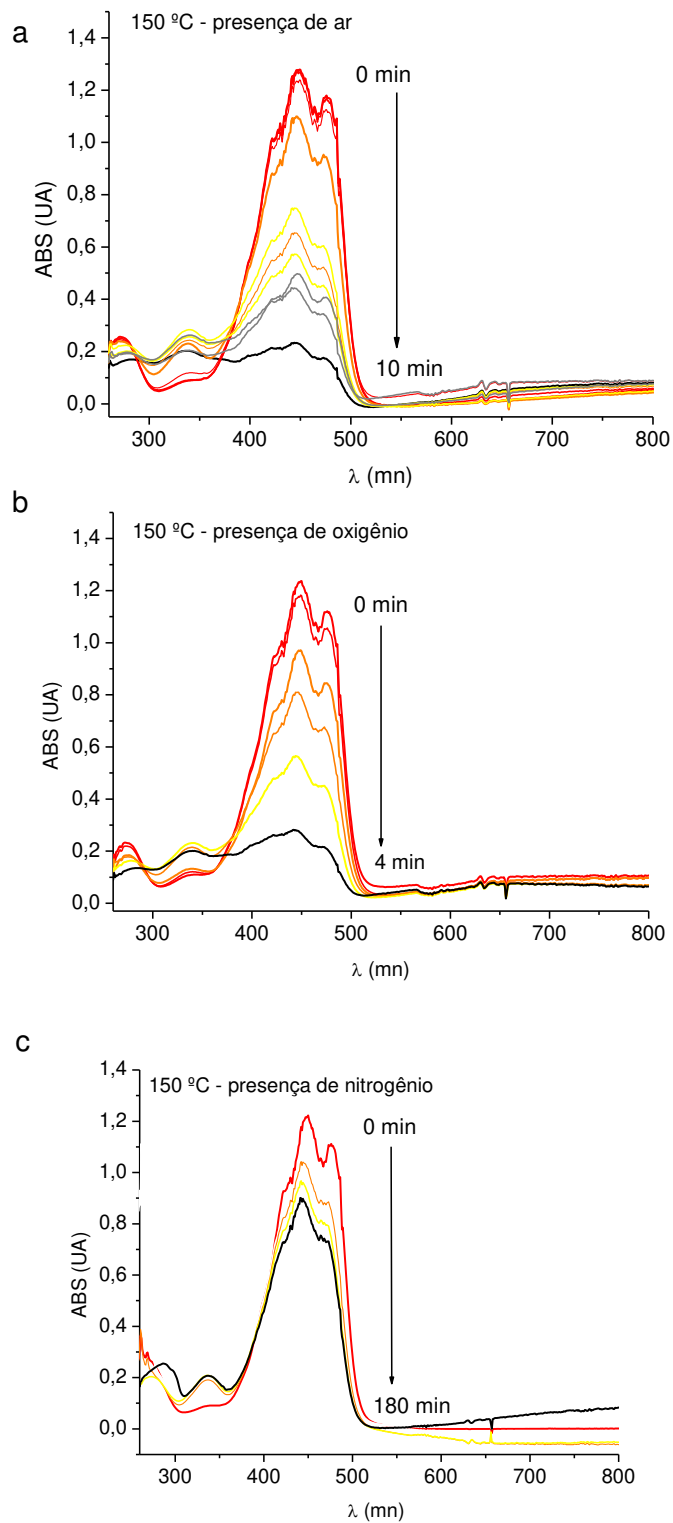


Figura 18. Espectros UV-visível de all-*trans*- $\beta$ -caroteno submetido ao aquecimento a 150 °C, em presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e de nitrogênio (c).

De forma geral, relacionando as alterações do espectro UV-visível durante o aquecimento a 120 e 150 °C observou-se mudanças no espectro em relação ao tempo zero (padrão de *all-trans*- $\beta$ -caroteno), pois compostos primários de degradação foram formados e, desta forma, houve o surgimento de uma banda em torno de 335 nm devido a formação de *cis*-isômeros e alteração da estrutura fina devido a presença de uma mistura de compostos (Figuras 15 e 18). Entretanto, no decorrer do aquecimento o  $\lambda_{\max}$  permaneceu em torno de 450 nm, pois o *all-trans*- $\beta$ -caroteno foi o composto majoritário.

### 5.2.3 Perfil de degradação térmica de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e de formação de isômeros *cis*, epóxidos e apocarotenóides

As quantidades de produtos formados em cada tempo e condição de aquecimento podem ser observadas nas Figuras 19 a 24. As tabelas com os compostos quantificados nas diferentes condições de aquecimento encontra-se no apêndice 1 (Tabelas 15 a 20). A porcentagem de cada composto foi calculada considerando como 100 % a somatória das áreas dos 14 compostos identificados, obtidas por HPLC.

Na condição de 120 °C com presença de ar (Figura 19) no tempo zero o sistema apresentou 98,9 % de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e 1,1 % de isômeros *cis*. Após 40 min de aquecimento, o *all-trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu para 90,0 % e a soma dos compostos de degradação e de isomerização aumentou para 10,0 %. Deste total, os compostos formados em ordem decrescente foram: 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (4,2 %), 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno (2,5 %), 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (1,3 %), 15-*cis*- $\beta$ -caroteno (0,9 %),  $\beta$ -apo-12'-carotenal (0,4 %),  $\beta$ -apo-10'-carotenal (0,3 %), a mistura *cis*-epóxi e diepóxi- $\beta$ -caroteno (0,2 %) e 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno (0,2 %). O isômero 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foi o composto de degradação encontrado em maiores porcentagens em todos os tempos de aquecimento. Ao final de 40 min de aquecimento, o teor de *all-trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu de 550,9 para 85,4  $\mu\text{g}/100$  mL, enquanto que o conteúdo dos isômeros e produtos de oxidação aumentou de 5,92 para 9,54  $\mu\text{g}/100$  mL.

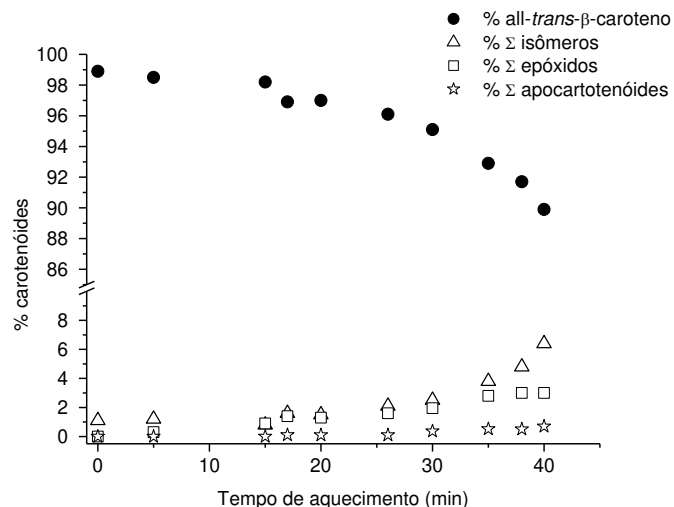


Figura 19. Degradação de all-*trans*-β-caroteno e formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 120 °C em presença de ar.

No sistema-modelo aquecido a 120 °C em presença de ar com galato de propila, no tempo zero foi encontrado 97,7 % de all-*trans*-β-caroteno e 2,3 % dos compostos de isomerização e de oxidação. Em 105 min de aquecimento, o all-*trans*-β-caroteno diminuiu para 93,8 % e a somatória dos compostos de oxidação e de isomerização aumentou para 6,2 %. O teor de all-*trans*-β-caroteno diminuiu de 613,9 (tempo zero) para 80,6 μg/100 mL em 105 min de aquecimento. O isômero 13-*cis*-β-caroteno representou 3,4 % do total dos carotenóides detectados, seguido por 0,7 % de 15-*cis*-β-caroteno, 0,7 % de 9-*cis*-β-caroteno, 0,5 % da mistura de *cis*-epóxi + diepóxi-β-caroteno, 0,3 % de 5,6-epóxi-β-caroteno, 0,3 % de β-apo-12'-carotenal e 0,2 % de β-apo-10'-carotenal (Figura 20). Assim, como no sistema submetido a 120 °C sem antioxidante, o isômero 13-*cis*-β-caroteno também foi o produto de degradação encontrado em maiores proporções.

Avaliando um tempo comum (40 min) em ambos os sistemas-modelo aquecidos a 120 °C na presença de ar, na condição sem adição do galato de propila foram detectados 10 % de produtos de degradação, enquanto que no sistema com a adição do antioxidante foram obtidos apenas 3 % desses compostos. Dessa forma, o uso do galato de propila apresentou-se como uma alternativa efetiva para o controle da degradação de β-caroteno, podendo ser aplicável em processamentos de alimentos submetidos a altas temperaturas.

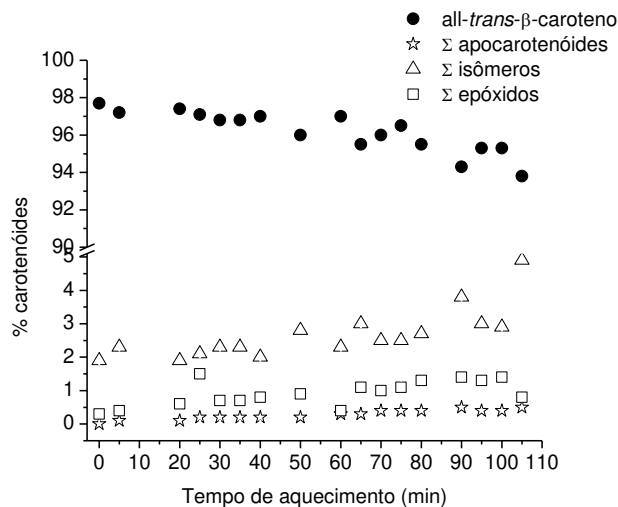


Figura 20. Degradação de all-*trans*-β-caroteno e formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 120 °C em presença de ar e galato de propila.

Berset & Marty (1992) também relataram taxas menores de degradação durante a extrusão em 181 a 186 °C, em sistema-modelo com β-caroteno e adição de diferentes concentrações de antioxidantes (100 ppm BHA, 250 ppm do extrato de alecrim, 500 ppm do extrato de alecrim, 500 ppm de α-tocoferol, e 50 ppm de BHT). O BHA e o extrato de alecrim apresentaram, respectivamente, a menor e a maior eficácia de proteção contra a degradação ocasionada pelo calor.

No sistema a 120 °C com fluxo de oxigênio (Figura 21), o tempo zero apresentou 98,1 % de all-*trans*-β-caroteno. Em 30 min de aquecimento, o all-*trans*-β-caroteno diminuiu para 95,6 % e a soma dos compostos de degradação e isomerização foi de 4,4 %. Do total de carotenóides, 3,0 % correspondeu ao composto 5,6-epóxi-β-caroteno, 0,9 % da mistura *cis*-epóxi + diepóxi-β-caroteno, 0,3 % de 13-*cis*-β-caroteno e 0,2 % de 9-*cis*-5,8-epóxi-β-caroteno. Este sistema-modelo foi a única condição em que um composto de oxidação, o 5,6-epóxi-β-caroteno, foi encontrado em maiores porcentagens em todos os tempos de aquecimento, ao invés dos isômeros *cis* de β-caroteno.



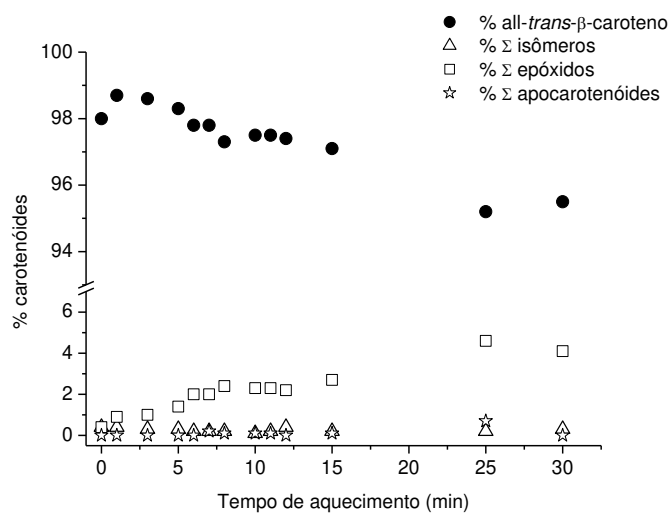


Figura 21. Degradação de all-*trans*-β-caroteno e formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 120 °C com fluxo de oxigênio.

De acordo com o esperado, todas as condições estudadas nos sistemas-modelo aquecidos a 150 °C apresentaram maior formação de isômeros e produtos de oxidação quando comparado aos sistemas a 120 °C.

No sistema-modelo a 150 °C, a presença de ar (Figura 22), reduziu de 98,5 % para 73,3 % o all-*trans*-β-caroteno após 9 min de aquecimento, com o aparecimento de 26,3 % de compostos de oxidação e isomerização. Do total de carotenóides, a quantidade de isômeros mono-*cis* de β-caroteno foi de 19 % e di-*cis* de β-caroteno de 1,9 %. O 13-*cis*-β-caroteno foi o majoritário com 9,6 %, seguido pelos isômeros 9-*cis*-β-caroteno com 7,9 %, 15-*cis*-β-caroteno com 1,5 %, 9,13'-di-*cis*-β-caroteno com 1,3 %, 9,13-di-*cis*-β-caroteno com 0,4 % e 9,15-di-*cis*-β-caroteno com 0,2 %. Os produtos de oxidação contribuíram com 5,4 %, sendo, 2,6 % de 5,6-epóxi-β-caroteno, 2,3 % de apocarotenóides e 0,5 % da mistura *cis*-epóxi com diepóxi-β-caroteno. O teor de all-*trans*-β-caroteno diminuiu de 658,8 para 91,2 μg/100 mL, enquanto que o conteúdo dos produtos de isomerização e de oxidação aumentou de 9,95 para 32,6 μg/100 mL.

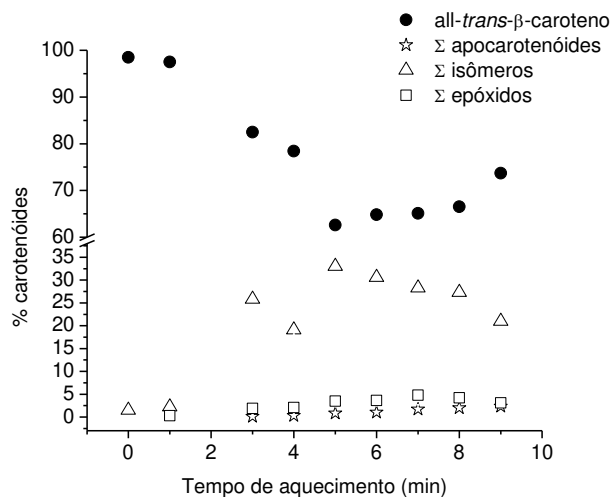


Figura 22. Degradação de *all-trans*-β-caroteno e formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 150 °C na presença de ar.

Já na presença de com fluxo de oxigênio a 150 °C (Figura 23) aumentou a degradação do *all-trans*-β-caroteno que passou de 98,7 % para 53,8 % após 4 min de aquecimento. As porcentagens dos compostos de isomerização e de oxidação, neste mesmo tempo de aquecimento, foram: 13,7 % de 13-*cis*-β-caroteno, 11,3 % de 9-*cis*-β-caroteno, 6,3 % de β-*apo*-12'-carotenal, 6,2 % de 5,6-epóxi-β-caroteno, 2,7 % de 15-*cis*-β-caroteno, 2,4 % de β-*apo*-10'-carotenal, 1,9 % 9,13'-*di-cis*-β-caroteno, 0,7 % de *cis*-epóxi com diepóxi-β-caroteno, 0,5 % de 9,13-*di-cis*-β-caroteno e 0,3 % de 9-*cis*-5,8-epóxi-β-caroteno. Ao contrário do sistema-modelo aquecido a 120 °C com fluxo de oxigênio, este sistema não apresentou o 5,6-epóxi-β-caroteno como majoritário. Ao final deste tempo de aquecimento, o teor de *all-trans*-β-caroteno diminuiu de 566,3 para 26,0 μg/100 mL, enquanto que a soma de epóxidos, apocarotenóides e isômeros *cis* aumentou de 7,6 para 22,3 μg/100 mL.

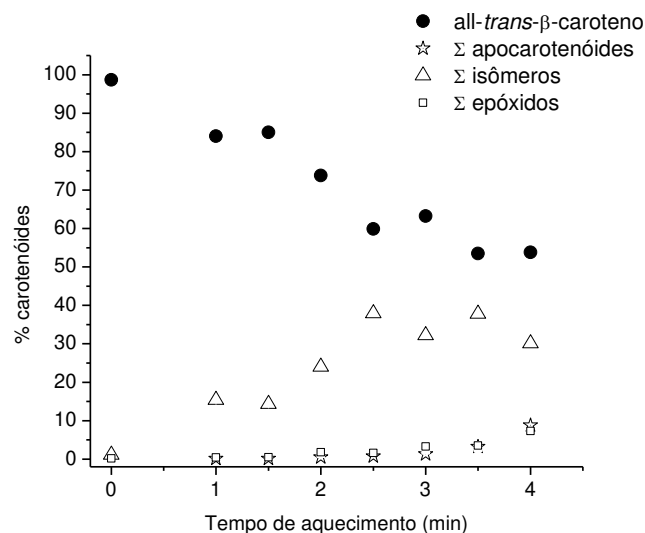


Figura 23. Degradação de all-*trans*-β-caroteno e de formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 150 °C com fluxo de oxigênio.

Ao aplicar fluxo de nitrogênio no sistema-modelo a 150 °C (Figura 24), a reação foi mais lenta e formou maiores quantidades de isômeros *cis*. O tempo inicial apresentou 97,8 % de all-*trans*-β-caroteno e após 180 min de aquecimento, o all-*trans*-β-caroteno diminuiu para 46,2 %. Nesse mesmo tempo de aquecimento, as porcentagens de isômeros formados foram: 9-*cis*-β-caroteno (23,7 %), 13-*cis*-β-caroteno (18,6 %), 9,13'-di-*cis*-β-caroteno (3,5 %) 15-*cis*-β-caroteno (2,9 %), 9,15-di-*cis*-β-caroteno (1,2 %), 9,13-di-*cis*-β-caroteno (1,0 %) e 13,15-di-*cis*-β-caroteno (0,3 %). Esta foi a única condição em que o 9-*cis*-β-caroteno foi o isômero majoritário, diferentemente dos demais sistemas cujo isômero majoritário foi o 13-*cis*-β-caroteno. Muitos autores citaram que, a partir do aquecimento de β-caroteno, o composto 13-*cis*-β-caroteno é preferencialmente formado em relação ao 9-*cis*-β-caroteno (Chandler & Schwartz, 1988; Chen, Chen & Chien, 1994; Chen & Huang, 1998; Henry, Catignani & Schwartz, 1998, Aman, Schieber & Carle, 2005; Mercadante, 2008). Além disso, isômeros di-*cis* são formados a partir dos mono-*cis* e estes a partir de all-*trans* (Brunner, 1997), por isso que a quantidade de isômeros di-*cis* foi inferior à quantidade de mono-*cis* em todos os sistemas estudados.

O sistema com fluxo de nitrogênio a 150 °C foi o que apresentou a maior formação de compostos não voláteis, de forma que aproximadamente 62 % do total de all-*trans* foi convertida em produtos de degradação, especialmente isômeros. Ao final de 180 min de

aquecimento, o teor de *all-trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu de 556,5 para 162,9  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ , enquanto que a soma dos isômeros *cis* aumentou de 9,94 para 180,8  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ .

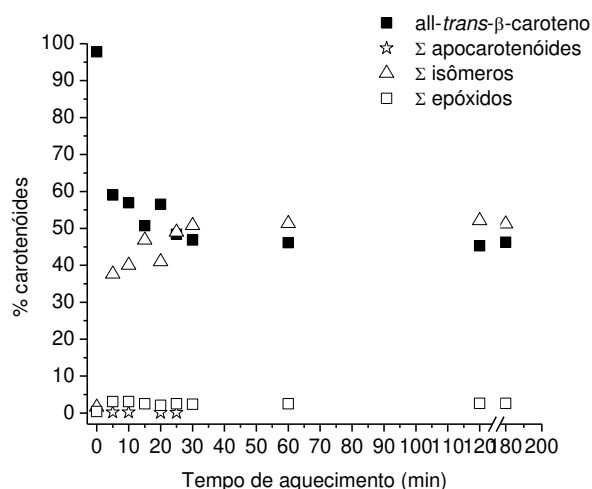


Figura 24. Degradação de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e formação de isômeros *cis* e produtos de oxidação a 150 °C com fluxo de nitrogênio.

Apesar de não ter sido realizada a análise de compostos de oxidação secundários, em todos os sistemas de aquecimento, sugere-se que ocorreu a formação de compostos voláteis, pois as quantidades perdidas da forma *all-trans*- $\beta$ -caroteno não foram compensadas pela formação dos isômeros *cis*, *di-cis* e dos produtos de oxidação primários. Nos sistemas aquecidos a 120 °C em presença de ar, sem e com galato de propila, e a 150 °C na presença de ar, 1,7 %, 0,9 % e 2,7 %, respectivamente, da perda total de *all-trans* foi convertida em produtos de degradação não voláteis. Nas condições com fluxo de oxigênio, a 120 e 150 °C a perda total de *all-trans* foi convertida em aproximadamente 0,7 % e 3,9 % de produtos de degradação não voláteis, respectivamente. Enquanto a 150 °C com fluxo de nitrogênio, 34,1 % foram convertidos em produtos de degradação, principalmente isômeros *cis*. Considerando apenas a formação dos produtos de degradação detectados por HPLC-DAD-MS/MS, ou seja, somente os produtos não voláteis, as principais reações observadas no aquecimento a 120 e 150 °C do  $\beta$ -caroteno foram de natureza reversível (isomerização) e irreversível (epoxidação e a clivagem oxidativa), sendo a primeira delas a predominante (Figura 25).

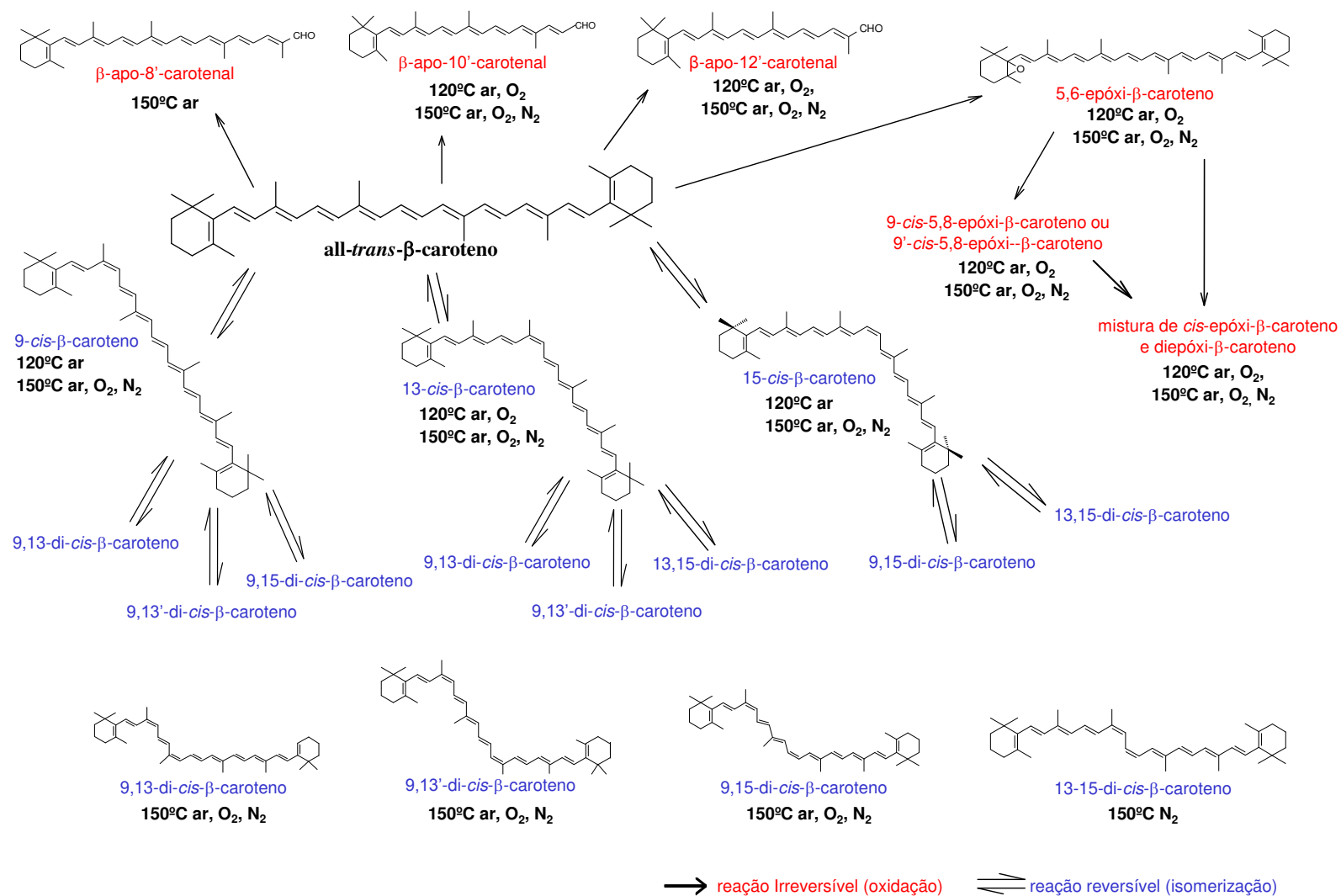


Figura 25. Mecanismo proposto para a formação de produtos da degradação de  $\beta$ -caroteno sólido aquecido a 120 e 150 °C com presença de ar, ar com galato de propila, fluxo de oxigênio e fluxo de nitrogênio.

#### 5.2.4 Efeito da degradação térmica de all-*trans*- $\beta$ -caroteno na cor da solução

No sistema CIELAB, o valor máximo de  $L^*$  (luminosidade) é 100 e representa uma perfeita reflexão difusa, enquanto que o valor mínimo é zero e constitui o preto. Os eixos  $a^*$  e  $b^*$  não possuem limites numéricos específicos. A coordenada  $a^*$  varia do vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ ), e a coordenada  $b^*$  do amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ).

Os valores médios obtidos das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e os índices colorimétricos após aquecimento a 120 °C do  $\beta$ -caroteno na presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila estão expostos na Tabela 5. Considerando o sistema espacial CIELAB (Figura 5), os valores  $a^*$  e  $b^*$  de todos os tempos de aquecimento se localizaram no 2º quadrante. Analisando isoladamente cada parâmetro, a coordenada  $b^*$  apresentou as maiores mudanças, enquanto a coordenada  $a^*$  apresentou deslocamento em direção aos valores positivos e em menores proporções quando comparada com a coordenada  $b^*$ . Por exemplo, no sistema-modelo com fluxo de oxigênio, após 30 min de aquecimento, foi observado ausência da cor amarela, pois o  $b^*$  foi 2,1. Já os valores da coordenada  $L^*$ , não apresentaram grandes alterações. Meléndez-Martínez, Vicário & Heredia (2003) e Lee & Coates, (1999) analisando suco de frutas verificaram mudanças semelhantes às observadas na Tabela 5.

A respeito do parâmetro croma ( $C^*_{ab}$ ), este demonstrou diminuição de 3 e 1,2 vezes em 40 min no aquecimento com ar, nos sistemas sem e com antioxidante. Nos tempos finais de aquecimento, as diminuições foram de 3, 3,4 e 32 vezes nas condições com ar sem antioxidante, ar com antioxidante e com fluxo com oxigênio. Isto demonstrou que em todos os sistemas as amostras tornaram-se pálidas devido à degradação do  $\beta$ -caroteno. Além disto, como observado com a coordenada  $b^*$ , o sistema com fluxo de oxigênio apresentou as maiores perdas da intensidade de cor.

Pela teoria da magnitude de cor de Francis & Clydesdale (1975), a qual estabelece que valores da  $\Delta E^*$  iguais ou superiores a duas unidades demonstra que dois tratamentos apresentam diferença perceptível visualmente, uma diferença perceptível no sistema a 120 °C em presença de ar sem e com antioxidante ocorreu com 15 min de aquecimento ( $\Delta E^*$  7,3 e 2,6, respectivamente), enquanto que com fluxo de oxigênio ocorreu em 3 min ( $\Delta E^*$  5,2) (Tabela 5). Além disso, a diferença global de cor apresentou comportamento linear com o aumento do tempo de aquecimento evidenciando a perda do cromóforo (Apêndice 2 – Figura 45). Os valores da coordenada  $b^*$  e de  $C^*_{ab}$  apresentaram comportamento em função do tempo similares (Apêndice 2 – Figura 43), bem como o

comportamento de degradação de carotenóides totais. Além disto, a análise de regressão evidenciou coeficientes superiores a 0,90 entre os parâmetros de cor *versus* teor de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e carotenóides totais, medidos em HPLC-DAD, e teor de carotenóides totais, medido em espectrofotômetro (Apêndice 2 – Tabela 21). Coeficientes de regressão ( $R^2$ ) inferiores a 0,90 somente foram detectados entre a  $\Delta E^*$  *versus*  $h_{ab}$  no experimento a 120 °C com fluxo de oxigênio, e com o parâmetro  $a^*$  *versus* *all-trans*- $\beta$ -caroteno e carotenóides totais, ambos medidos em HPLC-DAD, no aquecimento com presença de ar com galato de propila.

Tabela 5. Parâmetros de cor durante aquecimento a 120 °C do  $\beta$ -caroteno na presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
120 °C em presença de ar						
0	96,2	-9,7	65,0	65,8	98,5	0,0
15	96,5	-9,3	57,8	58,5	99,1	7,3
20	96,6	-9,2	57,2	58,0	99,2	7,8
25	97,0	-8,8	50,8	51,5	99,8	14,3
30	97,1	-8,3	46,1	46,8	100,2	19,0
35	98,0	-6,4	30,6	31,3	101,8	34,6
40	98,6	-4,8	21,0	21,5	102,9	44,4
120 °C com fluxo de oxigênio						
0	95,2	-9,9	69,9	70,6	98,1	0,0
1	95,0	-9,9	72,6	73,2	97,8	1,7
3	95,4	-9,5	63,5	64,2	98,5	5,2
5	95,6	-9,3	59,8	60,5	98,9	8,7
6	96,2	-8,5	48,7	49,4	99,9	10,4
7	96,3	-8,3	47,1	47,8	100,1	12,1
8	97,2	-6,4	31,3	32,0	101,6	13,9
10	97,6	-5,2	24,1	24,6	102,1	17,3
12	98,3	-2,9	12,1	12,4	103,4	20,8
15	98,5	-2,1	8,8	9,1	103,6	26,0
17	98,8	-1,5	6,1	6,3	104,4	29,4
20	98,7	-1,7	6,3	6,5	104,7	34,6
25	98,9	-0,8	2,3	3,1	105,0	43,3
27	98,9	-1,1	4,1	4,3	105,6	46,8
30	99,0	-0,7	2,1	2,2	107,9	52,0

Continuação da Tabela 4

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
120 °C em presença de ar e galato de propila						
0	91,0	-9,6	70,2	70,8	97,8	0,0
5	91,1	-9,6	69,4	70,1	97,9	0,8
10	91,2	-9,6	68,5	69,2	98,0	1,7
15	91,4	-9,6	67,6	68,2	98,1	2,6
20	91,5	-9,5	65,0	65,7	98,3	5,2
22	91,5	-9,5	66,6	67,2	98,2	3,6
25	91,7	-9,4	62,5	63,2	98,5	7,6
27	91,7	-9,5	64,7	65,4	98,4	5,5
30	91,9	-9,4	61,1	61,8	98,7	8,4
35	91,9	-9,3	61,5	62,2	98,7	7,1
40	92,2	-9,1	56,9	57,7	99,1	10,7
50	92,3	-9,1	56,6	57,3	99,2	8,5
60	92,5	-8,7	50,7	51,4	99,8	15,9
65	92,9	-8,0	43,7	44,4	100,3	19,0
70	93,2	-7,6	40,2	40,9	100,8	24,6
75	93,4	-7,4	38,1	38,9	101,0	23,1
85	93,3	-7,7	41,0	41,7	100,7	20,6
90	93,6	-7,0	35,4	36,1	101,2	21,6
95	93,7	-6,7	32,9	33,6	101,5	23,9
100	94,1	-5,6	25,9	26,5	102,2	25,1
105	94,5	-4,6	20,1	20,7	102,9	23,8

Os parâmetros de cor obtidos nos sistemas-modelo a 150 °C estão expostos na Tabela 6. Nesta temperatura, o sistema com fluxo de oxigênio apresentou as mudanças mais acentuadas, enquanto que no sistema com fluxo de nitrogênio os parâmetros foram pouco alterados o que também está de acordo com o observado na análise quantificação de carotenóides totais.

Uma sensível elevação dos valores de  $L^*$  e  $h_{ab}$  com o aumento do tempo de aquecimento foi observada em todos os sistemas a 150 °C. Essa modificação da cor para um aspecto mais claro em comparação com a condição inicial (tempo zero) ocorreu devido à maior degradação do  $\beta$ -caroteno. A coordenada  $b^*$  e o  $C^*_{ab}$  apresentaram o mesmo comportamento, pois no cálculo do croma maiores diferenças durante a degradação do  $\beta$ -caroteno foi observada com o parâmetro  $b^*$  do que com o parâmetro  $a^*$ .



Nos tempos finais de aquecimento, as diminuições de  $C_{ab}^*$  foram de 4,3, 2,8 e 1,4 vezes quando comparado com o inicial, nas condições com ar, com fluxo de oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Isto demonstrou que em todos os sistemas as amostras foram mudando sua coloração para um aspecto mais pálido devido à degradação do  $\beta$ -caroteno.

Em relação à mudança de cor perceptível a olho nu, relacionada aos valores superiores ou iguais a 2 de  $\Delta E^*$ , foi observado um  $\Delta E_{ab}^*$  de 2,7 em presença de ar após 1 min de aquecimento, um  $\Delta E_{ab}^*$  de 3,5 em fluxo de oxigênio após 0,5 min, e uma grande variação foi verificada após 5 min no sistema com fluxo de nitrogênio (Tabela 6). Essa variação, possivelmente, foi oriunda da formação dos produtos de degradação, em sua maioria *cis*-isômeros, os quais, pelas curvas de degradação de carotenóides totais, *all-trans*- $\beta$ -caroteno e formação de isômeros, foram mais intensos nos primeiros minutos do tratamento.

Em todos os experimentos a 150 °C a diferença global da cor apresentou alteração semelhante à do  $C_{ab}^*$  e do parâmetro  $b^*$  ao longo do tempo de tratamento, o que mostrou mais uma vez que o aquecimento levou à perda do cromóforo (Apêndice 2 – Figuras 44 e 46). Como era esperada, a análise de regressão entre carotenóides totais e os parâmetros de cor  $b^*$  e  $C_{ab}^*$  apresentaram  $R^2 > 0,96$ . Entretanto os demais parâmetros de cor quando relacionados com carotenóides totais (em HPLC e por espectrofotômetro) apresentaram menores valores de coeficiente de determinação do que nos sistemas a 120°C.

Tabela 6. Parâmetros de cor durante o aquecimento a 150 °C de  $\beta$ -caroteno na presença de ar, sob fluxo de oxigênio e fluxo de nitrogênio.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
150 °C em presença de ar						
0	94,1	-10,1	79,6	80,3	97,2	0,0
1	93,1	-10,0	77,1	77,8	97,4	2,7
3	93,6	-10,5	70,0	70,7	98,6	9,7
5	95,5	-10,4	53,4	54,4	101,0	26,3
6	96,2	-9,6	45,8	46,8	101,9	33,9
7	96,5	-8,5	36,3	37,2	103,2	43,5
8	96,0	-7,6	32,7	33,6	103,1	47,0
9	97,0	-6,1	24,8	25,6	103,7	55,0
10	97,3	-4,5	18,3	18,8	103,9	61,7

Continuação da Tabela 6

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
150 °C com fluxo de oxigênio						
0	93,6	-9,9	72,6	73,3	97,8	0,0
0,5	93,9	-10,2	69,2	69,9	98,4	3,5
1	94,0	-10,2	67,4	68,2	98,6	5,3
1,5	94,3	-10,2	64,1	64,8	99,0	8,6
2	94,5	-10,0	60,0	60,8	99,5	12,7
2,5	94,7	-10,2	57,1	58,0	100,1	15,5
3	95,6	-9,1	41,6	42,6	102,3	31,1
4	96,5	-6,3	25,3	26,1	104,0	47,5
150 °C com fluxo de nitrogênio						
0	95,6	-10,0	72,1	72,8	97,9	0,0
5	96,5	-11,0	60,5	61,5	100,3	11,6
10	96,7	-11,2	58,4	59,5	100,8	13,7
15	96,5	-11,7	61,2	62,3	100,8	11,1
20	96,6	-11,5	61,1	62,1	100,6	11,2
25	96,7	-11,8	60,7	61,9	101,0	11,5
30	96,5	-11,4	60,7	61,8	100,6	11,5
60	96,8	-11,7	57,3	58,4	101,5	15,0
120	96,8	-11,6	56,3	57,5	101,6	4,3
180	93,4	-10,7	49,5	50,6	102,2	7,7

Em síntese, os carotenóides totais (medido em espectrofotômetro) apresentaram elevados coeficientes de determinação com a coordenada  $b^*$  (componente que representa a cor amarela) e com  $C^*_{ab}$  (que mostra a saturação da cor), com valores de  $R^2$  superiores a 0,96 em todas as condições de aquecimento a 120 e 150 °C. Desta forma, a coordenada  $b^*$  e  $C^*_{ab}$  foram os parâmetros que melhor indicaram as mudanças de cor durante o aquecimento de  $\beta$ -caroteno e podem ser utilizados para estimar a concentração de carotenóides totais presente nestes sistemas-modelo.

Zepka et al. (2009) também mostraram que os parâmetros de cor, como  $\Delta E^*$ , foram bons indicadores da degradação térmica de all-*trans*- $\beta$ -criptoxantina e all-*trans*- $\beta$ -caroteno em suco de caju. Neste trabalho, curvas de decaimento dos principais carotenóides e mudanças de cor mostraram comportamento bifásico por meio de uma equação bi-exponencial no sistema simulador de suco de caju aquecido a 60 e 90 °C. Melendéz-Martínez, Vicario & Heredia (2003) observaram correlações significativas (com 95 % de significância) entre  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h_{ab}$  e o conteúdo de  $\beta$ -criptoxantina, luteína mais

zeaxantina e  $\beta$ -caroteno em suco de laranja. Além disso, apresentaram equações (por meio de modelos de equações múltiplas) que permitiram a determinação de níveis individuais dos carotenóides por meio dos parâmetros de cor da escala CIELAB, com valores de  $R^2$  superiores a 0,90.

### 5.2.5 Influência do aquecimento na capacidade antioxidante

A capacidade de desativação do radical  $ABTS^{*+}$  avaliada nas condições de aquecimento a 120 °C na presença de ar e fluxo de oxigênio esta apresentada na Figura 26. Como a adição de antioxidantes sintéticos, como galato de propila, apresenta influência nos resultados de TEAC devido à sua estrutura química (composto fenólico), a capacidade de desativação do radical  $ABTS^{*+}$  não foi analisada neste sistema-modelo.

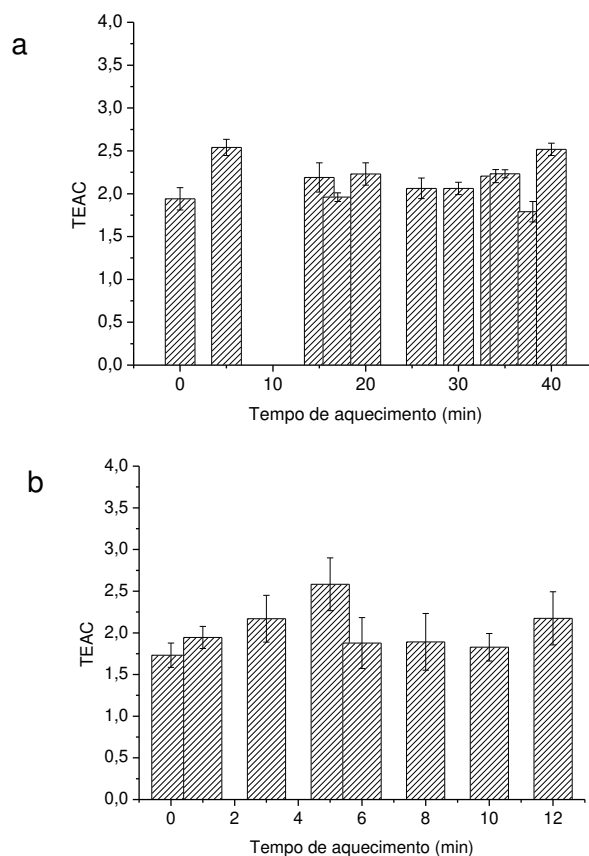


Figura 26. Capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) do sistema de  $\beta$ -caroteno aquecido a 120 °C na presença de ar (a) e com fluxo de oxigênio (b).

A capacidade de desativação do radical ABTS<sup>•+</sup> pela mistura de  $\beta$ -caroteno e pelos produtos de degradação nos sistemas aquecidos a 120 °C, expressa em TEAC, permaneceu em torno de 2 e não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tempos de aquecimento. Na condição a 120 °C em presença de ar, os valores de TEAC variaram de 1,8 a 2,5, com a média de  $2,2 \pm 0,3$ . Na condição com fluxo de oxigênio, os valores permaneceram entre 1,7 a 2,6 com a média de  $2,0 \pm 0,4$ .

No aquecimento a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio (Figura 27), apesar de estes sistemas terem apresentado maiores concentrações de epóxidos e isômeros que os sistemas a 120 °C, os valores de TEAC também permaneceram em torno de 2, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tempos de aquecimento. No aquecimento a 150 °C em presença de ar, os valores oscilaram de 1,7 a 2,5, com a média de  $2,1 \pm 0,3$ . No sistema com fluxo de oxigênio a 150 °C, os valores permaneceram entre 1,9 a 2,5, com a média de  $2,1 \pm 0,3$ , e no sistema aquecido com fluxo de nitrogênio os valores oscilaram de 2,0 a 2,7, apresentando o valor médio de  $2,3 \pm 0,3$ . O que indica que os compostos primários de degradação foram tão ativos quanto o *all-trans*- $\beta$ -caroteno na capacidade de desativação deste radical.

Valores de TEAC de 1,9, 2,6, 1,4 e 1,8 foram encontrados para o  $\beta$ -caroteno nos trabalhos de Miller et al. (1996), Re et al. (1999), Bohm et al. (2002) e Barreto (2008), respectivamente. Vale salientar que no trabalho de Miller et al. (1996) o dióxido de manganês foi utilizado na geração do ABTS<sup>•+</sup>, enquanto que nos outros trabalhos foi utilizado o permanganato de potássio, assim como no presente estudo.

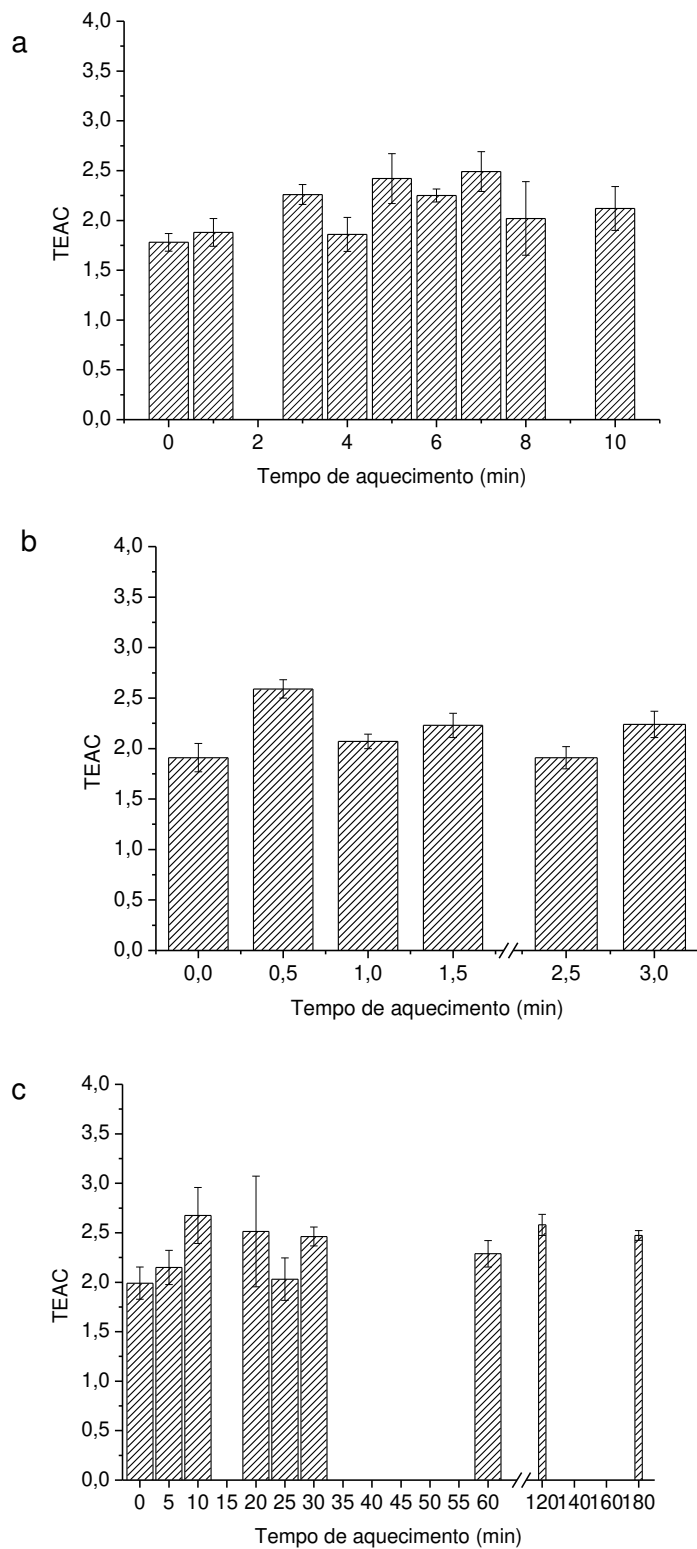


Figura 27. Capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC) do sistema de  $\beta$ -caroteno aquecido a 150 °C na presença de ar (a), com fluxo oxigênio (b) e de nitrogênio (c).

Em resumo, o valor médio de todos os sistemas no tempo zero, com pureza do all-*trans*- $\beta$ -caroteno superior a 98 %, foi de  $1,9 \pm 0,2$ . Nos tempos finais a % de all-*trans*- $\beta$ -caroteno variou de 95,5 a 46,7, enquanto os valores de TEAC foram similares nos sistemas-modelo a 120 e 150 °C. Desta forma, os resultados indicam que os compostos de degradação formados durante o aquecimento continuam ativos na capacidade de desativação do radical ABTS<sup>•+</sup>. Este comportamento também foi observado por Bohm et al. (2002), pois os isômeros 9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis* e all-*trans*- $\beta$ -caroteno apresentaram valores de TEAC entre 1,2 e 1,4, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Além disso, Pérez-Conesa et al. (2009) mencionaram que o valor de TEAC obtido em amostras de purê de tomate contendo isômeros de licopeno e de  $\beta$ -caroteno não foram influenciados significativamente a 98, 108 e 128 °C quando comparado com as amostras não aquecidas.

Como não existe um procedimento metodológico universal capaz de avaliar a capacidade antioxidante exata de uma amostra, há a necessidade de medir a capacidade antioxidante por diferentes métodos, com mecanismos diferentes de ação. Desta forma, a metodologia de proteção contra o oxigênio singlete também foi avaliada, pelo fato dos carotenóides serem eficientes desativadores desta espécie reativa.

As Figuras 28 e 29 apresentam os resultados da mistura de  $\beta$ -caroteno e produtos de degradação frente ao  $^1\text{O}_2$ , calculada através do efeito protetor das amostras sobre o actinômetro dimetil-antraceno, utilizando azul de metileno como sensibilizador. Vale salientar novamente que para verificar a influência dos compostos de degradação na capacidade de desativação do  $^1\text{O}_2$ , o teor de carotenóides totais para todas as amostras com diferentes tempos de aquecimento e condições experimentais foi também padronizado conforme descrito no material e métodos.

Os valores de porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete no tempo inicial e nos demais tempos a 120 °C não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Na presença de ar, com e sem galato de propila, os valores permaneceram entre 15,8 a 22,5 % e 12,1 a 16,0 %, respectivamente, e, além disso, no sistema com fluxo de oxigênio os valores variaram de 12,4 a 14,9 %, com a média de  $13,8 \pm 1,4$  % (Figura 28).

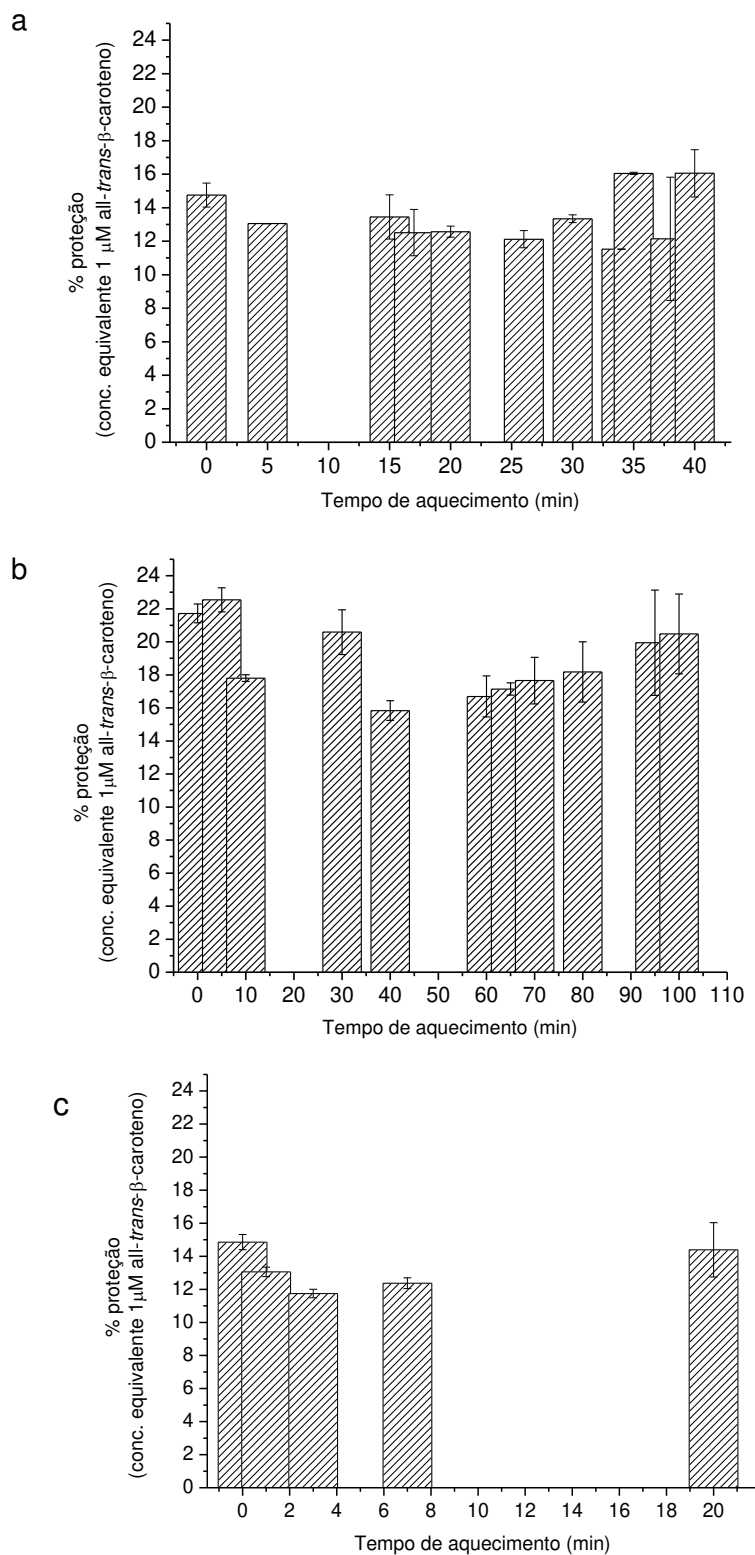


Figura 28. Efeito protetor contra oxigênio singlete do sistema de  $\beta$ -caroteno submetido a diferentes tempos de aquecimento a 120 °C em presença de ar (a), ar com galato de propila (b) e fluxo de oxigênio (c).

Na literatura existem poucas evidências sobre as interações de carotenóides com outros antioxidantes. O trabalho de Kiokias & Oreopoulou (2006) estudou a atividade antioxidante do  $\beta$ -caroteno (1 g/L) com a adição de ácido ascórbico (0,1 g/L) em emulsão alimentícia com oxidação iniciada com o gerador de radicais AAPH (2,2-azobis-dicloridrato amidinopropano). A presença do ácido ascórbico exerceu uma leve tendência (não significativa) de aumento da atividade antioxidante quando comparado ao carotenóide sem a presença do ácido ascórbico. Kim et al. (2009) estudaram os efeitos de antioxidantes BHA, BHT e TBHQ na foto-oxidação de ácido linoleico utilizando azul de metileno como sensibilizador. Nesse trabalho, os resultados mostraram que o *quenching* do oxigênio singlete pelos antioxidantes sintéticos foi baseado no mecanismo de transferência de carga. Além disso, o TBHQ apresentou valores de atividade semelhante ao antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, seguido dos valores de proteção mais eficientes observados com BHA e BHT, respectivamente. Entretanto, o galato de propila não foi estudado neste trabalho.

Em relação aos sistemas-modelo a 150 °C, os resultados da mistura de  $\beta$ -caroteno e produtos de degradação, com valores de porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete também não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tempos de aquecimento. Na presença de ar os valores permaneceram entre 11,3 a 18,4 %, com a média de  $15,2 \pm 3,1$  %, com fluxo de oxigênio os valores oscilaram de 16,1 a 21,6 %, com a média de  $17,9 \pm 2,1$  %, e com fluxo de nitrogênio oscilaram de 13,9 a 17,4 %, apresentando o valor médio de  $16,2 \pm 1,29$  % (Figura 29).



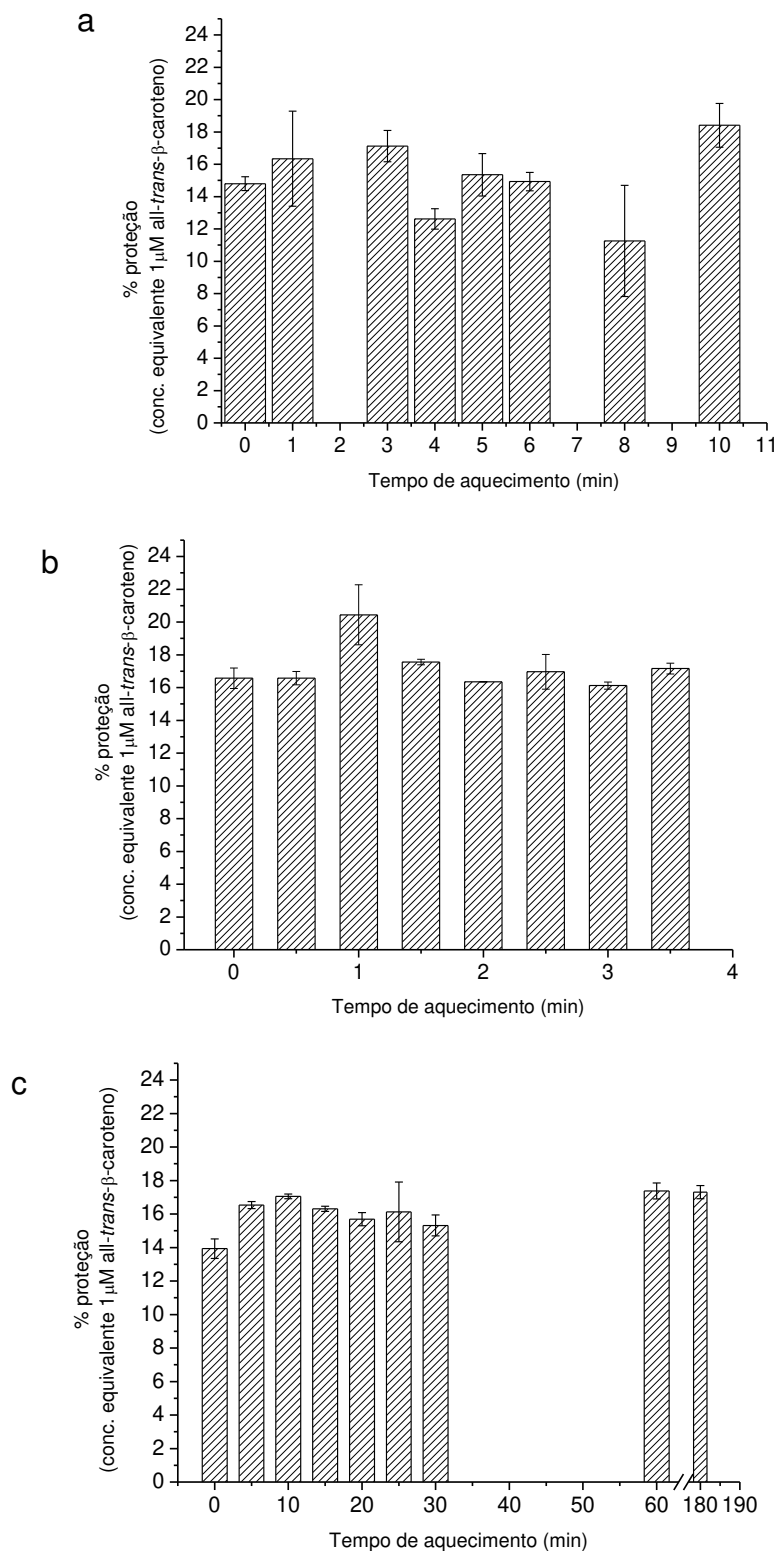


Figura 29. Efeito protetor contra oxigênio singlete do sistema de  $\beta$ -caroteno submetido a diferentes tempos de aquecimento a 150 °C na presença de ar (a), fluxo de oxigênio (b) e de nitrogênio (c).

Conn, Schalch & Truscott (1991) e Stahl & Sies (1993) obtiveram valores de desativação do oxigênio singlete similares para os isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno quando comparados à forma *all-trans*. Ao utilizar benzeno como solvente, o valor da constante de desativação do  $^1\text{O}_2$  para o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno foi de  $11 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e para o 15-*cis*- $\beta$ -caroteno foi de  $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Ao utilizar tolueno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno apresentou valor de desativação do  $^1\text{O}_2$  de  $11 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , e para 15-*cis*- $\beta$ -caroteno o valor foi de  $12 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , enquanto o *all-trans*- $\beta$ -caroteno apresentou valores de desativação do  $^1\text{O}_2$  de  $13 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  em benzeno e  $14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  em tolueno. O que mostrou que tanto a análise com isômeros, como o uso de solventes diferentes para solubilizar o carotenóide foi obtido constantes similares.

O sistema-modelo com fluxo de nitrogênio, condição que apresentou maior estabilidade do *all-trans*- $\beta$ -caroteno, bem como maior conversão em produtos de degradação primários, não demonstrou impacto diferente na porcentagem de proteção de  $^1\text{O}_2$ .

Assim, a capacidade antioxidante, medida tanto pela desativação do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  como desativação do  $^1\text{O}_2$ , das misturas de  $\beta$ -caroteno com os produtos de degradação térmica apresentaram valores sem diferença significativa quando comparados ao padrão de *all-trans*- $\beta$ -caroteno, independente do tempo de tratamento térmico.

### 5.3 Degradação química do $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA

#### 5.3.1 Identificação dos principais compostos formados na reação de *all-trans*- $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA

A Figura 30 apresenta os cromatogramas obtidos em diferentes estágios da reação química de clivagem oxidativa catalisada por  $\text{KMnO}_4$ , e a identificação dos picos, informações espectrais e cromatográficas estão mostradas na Tabelas 7. Os cromatogramas obtidos em diferentes estágios da reação química de epoxidação catalisada por MCPBA estão apresentados na Figura 31, e a identificação dos picos, e as informações espectrais e cromatográficas são mostradas na Tabela 8.

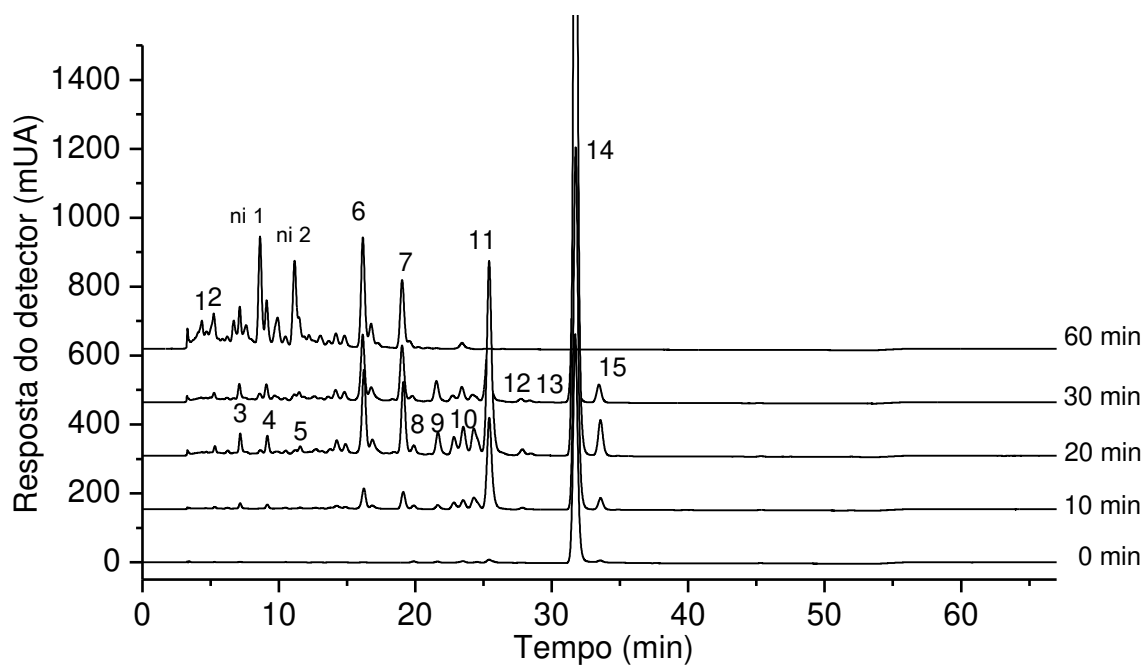


Figura 30. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos da reação de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$ . As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados durante a reação química do  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$ .

Pico	Carotenóide	$t_R(\text{min})^a$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})^b$	% III/II	% A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentação de íons MS/MS (m/z)
1	$\beta$ -apo-15-carotenal	4,7	372	0	0	285	267[M+H-18] <sup>+</sup>
2	$\beta$ -apo-14'-carotenal	5,2	411	0	0	311	293[M+H-18] <sup>+</sup>
3	$\beta$ -apo-12'-carotenal	7,2	425	0	0	351	333[M+H-18] <sup>+</sup>
ni <sup>1</sup>	não identificado 1	8,6	466, 488	0	0	449	431[M+H-18] <sup>+</sup> , 413 [M+H-18] <sup>+</sup> , 221
4	$\beta$ -apo-10'-carotenal	9,1	441	0	0	377	359[M+H-18] <sup>+</sup>
ni <sup>2</sup>	não identificado 2	11,1	479, 500	0	0	601	583[M+H-18] <sup>+</sup> , 565 [M+H-18] <sup>+</sup> , 547[M+H-18] <sup>+</sup> , 445[M+H-156] <sup>+</sup> , 261 [M+H-340] <sup>+</sup> , 221
5	<i>cis</i> - $\beta$ -apo-8'-carotenal <sup>c</sup>	11,5	337, 453	0	37	417	399[M+H-18] <sup>+</sup>
6	$\beta$ -apo-8'-carotenal	16,2	462	0	0	417	399[M+H-18] <sup>+</sup>
7	semi- $\beta$ -carotenona	19,1	471	0	0	569	551[M+H-18] <sup>+</sup>
8	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	21,7	425, 449, 473	54	0	553	535[M+H-18] <sup>+</sup>
9	mistura 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno + diepóxi- $\beta$ -caroteno	23,5	410, 427, 452	54	5	569/ 553	551[M+H-18] <sup>+</sup> , 495, 205 535[M+H-18] <sup>+</sup> , 495, 205
10	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	24,3	337, 420, 448, 470	0	55	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
11	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	25,4	338, 420, 444, 469	11	44	537	444[M-92] <sup>+</sup>
12	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno ou 9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	27,8	338, 420, 440, 465	10	16	537	444[M-92] <sup>+</sup>
13	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	28,5	410, 431, 455	66	6	553	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 496[M+H-58] <sup>+</sup>
14	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	31,7	425, 452, 477	27	0	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
15	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	33,6	340, 420, 445, 473	25	8	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>

<sup>a</sup>Tempo de retenção em coluna C<sub>30</sub> utilizando gradiente linear de MeOH/MTBE.

<sup>b</sup>Gradiente linear de MeOH/MTBE.

<sup>c</sup>Tentativa de identificação.

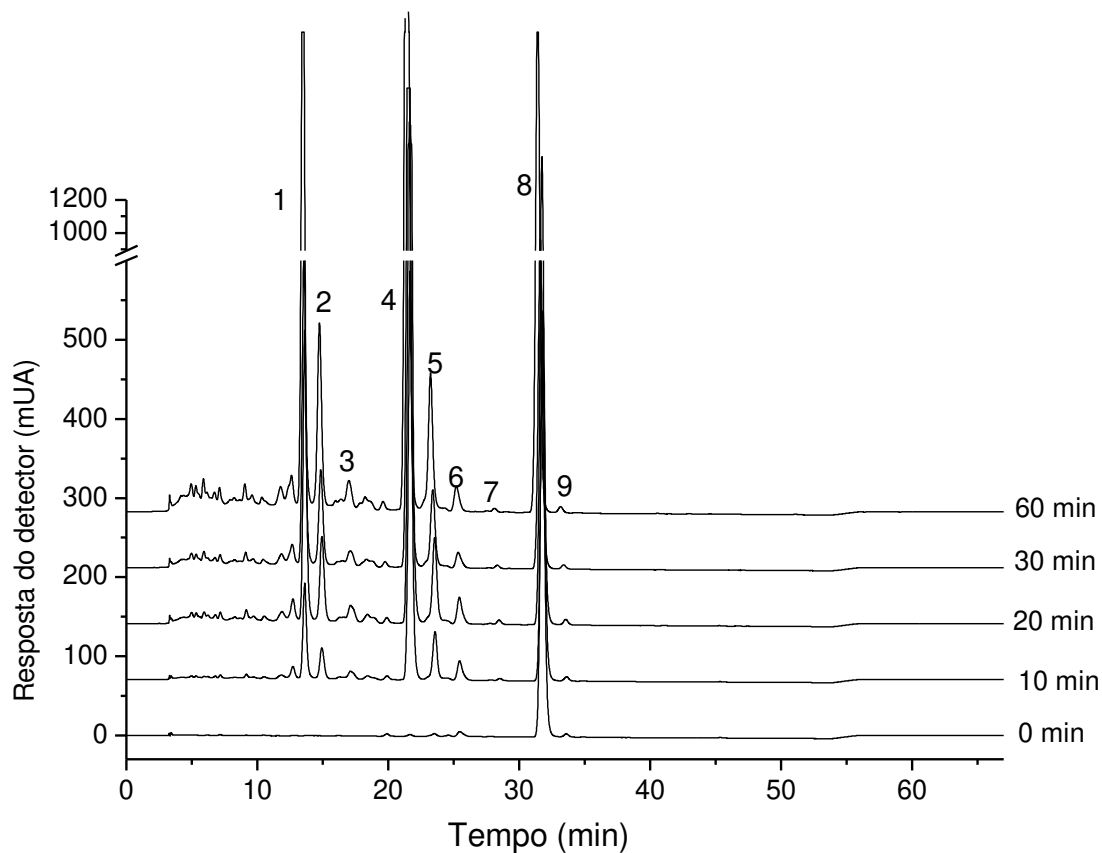


Figura 31. Perfil cromatográfico, processados a 450 nm, obtido por HPLC-DAD, após 0, 10, 20, 30 e 60 minutos da reação de  $\beta$ -caroteno com MCPBA. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.7. A identidade dos picos encontra-se na Tabela. 8.

Tabela 8. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos detectados durante a reação química do  $\beta$ -caroteno com MCPBA.

Pico	Carotenóide	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	$\lambda_{max}$ (nm) <sup>b</sup>	% III/II	% A <sub>B</sub> /A <sub>II</sub>	[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentação de íons MS/MS (m/z)
1	5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno	13,5	320, 395, 416, 438, 468	95	4	569	551 <sup>d</sup> [M+H-18] <sup>+</sup> , 533 [M+H-18-18] <sup>+</sup> , 477[M+H-92] <sup>+</sup> , 205
2	5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno	14,7	312, 421, 468	78	6	569	551[M+H-18] <sup>+</sup> , 533[M+H-18] <sup>+</sup> , 477[M+H-92] <sup>+</sup> , 205
3	mistura <i>cis</i> -epóxi + diepóxi- $\beta$ -caroteno	16,9	330, 429	nc	45	569, 553	551[M+H-18] <sup>+</sup> , 205 535[M+H-18] <sup>+</sup> , 205
4	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	21,7	425, 445, 472	73	5	553	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 495, 205
5	5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	23,2	313, 405, 427, 452	64	8	553	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 495, 205
6	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	25,4	338, 420, 444, 470	11	42	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
7	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno <sup>c</sup>	28,5	410, 430, 455	60	6	553	535[M+H-18] <sup>+</sup> , 495[M+H-58] <sup>+</sup> , 205
8	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	31,7	425, 452, 477	27	0	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>
9	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	33,6	340, 420, 445, 473	25	8	537	444[M-92] <sup>+</sup> , 399[M-137] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Tempo de retenção em coluna C<sub>30</sub> utilizando gradiente linear de MeOH/MTBE.

<sup>b</sup> Gradiente linear de MeOH/MTBE

<sup>c</sup> Tentativa de identificação

<sup>d</sup> Fragmentação na fonte

nc: não calculado

Na clivagem oxidativa catalisada por  $\text{KMnO}_4$  foram identificados 15 carotenóides. O  $\beta$ -apo-15-carotenal (pico 1, Tabela 7) foi o primeiro carotenóide a eluir na coluna  $\text{C}_{30}$  pois foi o composto de degradação com menor massa molecular. A identificação foi confirmada pela molécula protonada ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) a  $m/z$  285, com perda de 18 u (característico da eliminação de uma molécula de água) devido à presença do grupo aldeído.

O segundo carotenóide a eluir foi o  $\beta$ -apo-14'-carotenal (pico 2, Tabela 7) com  $\lambda_{\text{max}}$  em 411 nm, molécula protonada ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) a  $m/z$  311 e fragmento caracterizado pela eliminação de uma molécula de água ( $m/z$  393,  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ ).

O pico 5, tentativamente identificado como o isômero *cis*- $\beta$ -apo-8'-carotenal, apresentou pico *cis* em 337 nm com intensidade de 37 %, deslocamento hipsocrômico de 9 nm em relação ao correspondente isômero *all-trans*, molécula protonada ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) a  $m/z$  417 e fragmento caracterizado pela eliminação de uma molécula de água ( $m/z$  399  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ ), igual ao composto  $\beta$ -apo-8'-carotenal. Além disso, como o *cis*- $\beta$ -apo-8'-carotenal eluiu antes de sua forma *all-trans*, indica que pode ser um isômero 13-*cis* ou 15-*cis*- $\beta$ -apo-8'-carotenal.

O pico 7 da Tabela 7 foi identificado como um secocarotenóide, a semi- $\beta$ -carotenona, pois apresentou espectro UV-visível com  $\lambda_{\text{max}}$  em 471 nm, ausência de pico *cis* e estrutura fina,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  569 correspondente à sua fórmula estrutural  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ , com fragmento MS/MS a  $m/z$  551  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$  relacionado com a perda de uma molécula de água. Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007) também identificaram este composto durante a clivagem oxidativa com  $\beta$ -caroteno.

O pico 9 da tabela 6 foi tentativamente identificado como uma mistura, pois apresentou moléculas protonadas  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  553, característica de um mono epóxi- $\beta$ -caroteno, e a  $m/z$  569, correspondente a um diepóxi- $\beta$ -caroteno, com fragmentos MS/MS a  $m/z$  535  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ , 551  $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ , 495 e 205. O fragmento a  $m/z$  205 confirma a presença de pelo menos um grupo terminal 5,6- ou 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno. O deslocamento hipsocrômico foi de 25 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  de 410, 427, 452 nm) quando comparado à forma *all-trans*- $\beta$ -caroteno e tempo de retenção de 25,3 minutos, sendo que essas características sugerem que seja uma mistura de 9-*cis*-diepóxi com 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno.

O pico 12 foi tentativamente identificado como 9,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno ou 9,13'-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, pois apresentou deslocamento hipsocrômico de 12 nm em comparação com a forma *all-trans*, menor intensidade do pico *cis* que os isômeros 13- e 15-*cis*- $\beta$ -caroteno (%  $A_{\text{B}}/A_{\text{I}}$  de 16) e ordem de eluição compatível com o trabalho de Brunner

(1997).

Não foi possível identificar os picos ni 1 e ni 2 com as informações disponíveis no momento. Os demais compostos identificados:  $\beta$ -apo-12'-carotenal,  $\beta$ -apo-10'-carotenal,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 15-*cis*- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno não foram discutidos novamente porque suas informações espectrais e cromatográficas já haviam sido mencionadas na degradação térmica de  $\beta$ -caroteno, item 5.2.1.

Na reação de epoxidação catalisada por MCPBA foram identificados nove carotenóides. Entre esses carotenóides, os compostos que ainda não foram discutidos acima são apresentados a seguir.

O pico 1 da tabela 8 foi caracterizado como 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno pois apresentou espectro de massas com molécula protonada a  $m/z$  569 com perda de água correspondente à eliminação dos grupos epóxidos de ambos os lados da molécula ( $m/z$  551 [M+H-18]<sup>+</sup> e 533 [M+H-18-18]<sup>+</sup>, e o fragmento a  $m/z$  205 confirmou a presença de um anel  $\beta$  com grupo epóxido. A entrada do grupo epóxido ocasionou a diminuição no sistema de ligações duplas conjugadas e, por consequência, deslocamento hipsocrômico, em relação ao *all-trans*, em torno de 6 nm para cada grupo 5,6-epóxido. Como nos dois lados da molécula houve ataque eletrofílico pelo ação do MCPBA, observou-se um deslocamento de 14 nm.

O espectro de massas do 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno (pico 2, tabela 7) apresentou as mesmas características do espectro do pico 1. Entretanto, apresentou menor estrutura fina (% III/II de 78) e diminuição de 31 nm no  $\lambda_{\max}$  quando comparado à forma *all-trans*. Esta perda está condizente com o rearranjo epóxido-furanóide onde ocorre um deslocamento hipsocrômico em torno de 25 nm, enquanto que no lado com grupamento 5,6-epóxi ocorre um deslocamento hipsocrômico em torno de 6 nm, ambos em comparação com a forma *all-trans*.

O pico 3 da tabela 7 foi considerado como uma mistura, pois apresentou [M+H]<sup>+</sup> a  $m/z$  553, correspondente à um mono-epóxido, e a  $m/z$  569, característico de diepóxi- $\beta$ -caroteno. O deslocamento hipsocrômico foi de 23 nm com presença de um pico *cis* a 330 nm e %  $A_B/A_{II}$  de 45, o que, provavelmente, indica a presença de um isômero *cis*-epóxi derivado do 5,6 ou do 5,8-epóxi. Além disso, a presença de pico *cis* com alta intensidade, característica da isomeria 13- ou 15-*cis*, e a ordem de eluição em coluna  $C_{30}$  antes dos mono-epóxidos indica que esta mistura provavelmente contém um isômero 13-*cis*-5,6 ou 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno.



Os demais compostos, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, formados em diferentes quantidades nos tempos de reação tiveram suas características espectroscópicas e cromatográficas explicadas no item 5.2.1.

### 5.3.2 Degradação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno induzida por reações químicas e formação de compostos de degradação

Para cálculo e discussão da quantidade relativa de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e dos produtos formados no sistema reacional, foi considerada a somatória da área total de todos os picos separados por HPLC e detectados no DAD.

Após 10 min da reação com  $\text{KMnO}_4$ , aconteceu uma diminuição de 99,0 % para 43,9 % de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e um aumento de 1,0 % para 56,1 % de isômeros *cis* (Figura 32). Do total de produtos de degradação foram detectados em ordem decrescente: apocarotenóides 17,2% ( $\beta$ -apo-14'-,  $\beta$ -apo-12'-,  $\beta$ -apo-10'-, *cis*- $\beta$ -apo-8'- e  $\beta$ -apo-8'-carotenal), 16,8 % de isômeros *cis* (15-*cis*, 13-*cis*- e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno), 11,3 % de secocarotenóide (semi- $\beta$ -carotenona), 3,4 % de epóxidos (mistura de epóxidos e 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno) e 7,3 % de picos presentes em pequenas quantidades que não foram identificados. Em 20 min de reação, o all-*trans*- $\beta$ -caroteno foi totalmente consumido ocorrendo a maior formação de compostos de degradação, cuja distribuição, em ordem decrescente, foi a seguinte:  $\beta$ -apo-8'-carotenal (21,7 %), semi- $\beta$ -carotenona (20,2 %),  $\beta$ -apo-10'-carotenal (5,0 %), *cis*- $\beta$ -apo-8'-carotenal (3,6 %),  $\beta$ -apo-12'-carotenal (3,6 %),  $\beta$ -apo-14'-carotenal (2,6 %), mistura epóxi- $\beta$ -caroteno com diepóxi- $\beta$ -caroteno (2,5 %) e a soma dos picos não identificados aumentou para 39,5 %. Em 30 min, a porcentagem dos picos não identificados aumentou para 66,6 %, pois as condições do meio também favoreceram a degradação dos compostos de oxidação primários. Por exemplo, a porcentagem de  $\beta$ -apo-8'-carotenal no tempo 20 min era de 21,7 % e em 30 min diminuiu para 12,1 %. A porcentagem dos outros apocarotenóides foi de 5,7 %  $\beta$ -apo-14'-carotenal, 5,5 %  $\beta$ -apo-10'-carotenal, 4,4 %  $\beta$ -apo-12'-carotenal, 1,2 %  $\beta$ -apo-15-carotenal e a semi- $\beta$ -carotenona foi de 4,3 % em 30 min de reação.

Em 60 min, o percentual de picos não identificados continuou aumentando, mais de 33,5 % fez o restante dos picos não identificados, o pico não identificado número 1 (ni 1) apresentou 31,3 % e o pico ni 2 18,2 %. Em termos quantitativos, o all-*trans*- $\beta$ -

caroteno diminuiu de 975,6  $\mu\text{g/mL}$  para níveis não detectáveis ( $\leq 3,97 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que o conteúdo dos produtos de degradação aumentou de 9,1 para 464,79  $\mu\text{g/mL}$  após 60 min de reação.

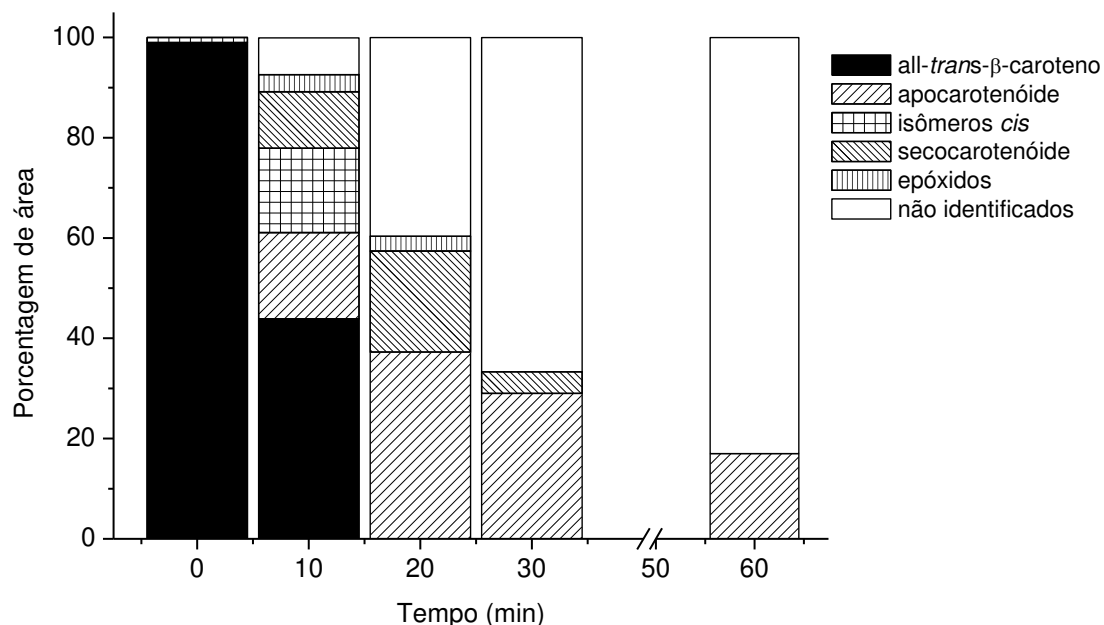


Figura 32. Distribuição, em porcentagem (%), de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e dos compostos formados ao longo da reação química com  $\text{KMnO}_4$ .

Na reação com MCPBA, o tempo zero apresentou 98,8 % de all-*trans*- $\beta$ -caroteno e 1,2 % de isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno (Figura 33). Em 10 min, o ataque eletrofílico pelo MCPBA na molécula de all-*trans*- $\beta$ -caroteno ocasionou a degradação de 61 % do padrão, sendo formados 57,0 % de epóxidos. Do total de carotenóides, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno perfaz 39,1 %, 8,4 % de 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,4 % de 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, 3,2 % de 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno e 0,9 % da mistura de *cis*-epóxi + diepóxi- $\beta$ -caroteno. Os restantes, 5,3 % da área dos picos detectados, foram isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno e compostos não identificados. Em 20 min de reação, 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno continuou como o composto majoritário com 43,0 % da área total. Os outros compostos de degradação presentes foram 13,2 % de 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,5 % de 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, 4,7 % de 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 1,7 % de 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 1,0 % da mistura de *cis*-epóxi + diepóxi- $\beta$ -caroteno e 0,2 % de 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Além disto, a porcentagem de all-*trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu para 26,5 % e 3,5 % dos compostos não foram identificados.

Em 30 min, a quantidade relativa dos compostos foi semelhante ao tempo de 20

min, com um ligeiro aumento para 17,1 % de 5,6:5',6' e 6,0 % de 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno. Por outro lado, all-*trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu de 28,4 % em 20 min para 21,5 %.

Em 60 min de reação, ainda restou 18,9 % de isômeros *cis* de  $\beta$ -caroteno, e as quantidades relativas dos compostos de degradação foram: 42,4 % de 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 18,2 % de 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 7,0 % 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, 5,7 % 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 1,2 % da mistura de *cis*-epóxi + diepóxi- $\beta$ -caroteno (Figura 33). Ao contrário da reação de clivagem oxidativa, os epóxidos formados, bem como a somatória dos picos não identificados, se mantiveram estáveis durante o acompanhamento da reação de epoxidação. Além disto, o  $\beta$ -caroteno não foi totalmente consumido nos tempos monitorados.

Em termos quantitativos, o all-*trans*- $\beta$ -caroteno diminuiu de 1035,1  $\mu\text{g/mL}$  para 31,4  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que o conteúdo dos produtos de degradação aumentou de 8,1 para 135,2  $\mu\text{g/mL}$  após 60 min de reação de epoxidação com MCPBA.

Durante a reação de  $\beta$ -caroteno com MCPBA, Rodrigues & Rodriguez-Amaya (2007) e Ribeiro (2011) verificaram a formação de 5,6 e 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 5,6:5',8' e 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno, este último, formado em maior quantidade nos dois trabalhos. Em nosso estudo, o 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno foi o majoritário, possivelmente pelo fato do ácido MCPBA ter sido adicionado de uma só vez no meio e não gotejado como no trabalho Rodriguez & Rodriguez-Amaya (2007) e de Ribeiro (2011), o que poderia ter provocado uma saturação no meio. Além disto, menores quantidades dos derivados 5,8-furanóide em relação às de 5,6-epóxido foram detectadas devido à adição do sal de  $\text{NaHCO}_3$  no meio da reação, o qual atuou como *mop out* do ácido liberado pelo MCPBA (Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2007). A epoxidação nas posições 5,6- ou 5',6'- foi favorecida pela presença do anel  $\beta$ -ionona, onde as ligações duplas terminais apresentam maior densidade eletrônica que as de cadeia poliênica e, conseqüentemente, favorecem o ataque pelo MCPBA (Chichester & McFeeters, 1971).

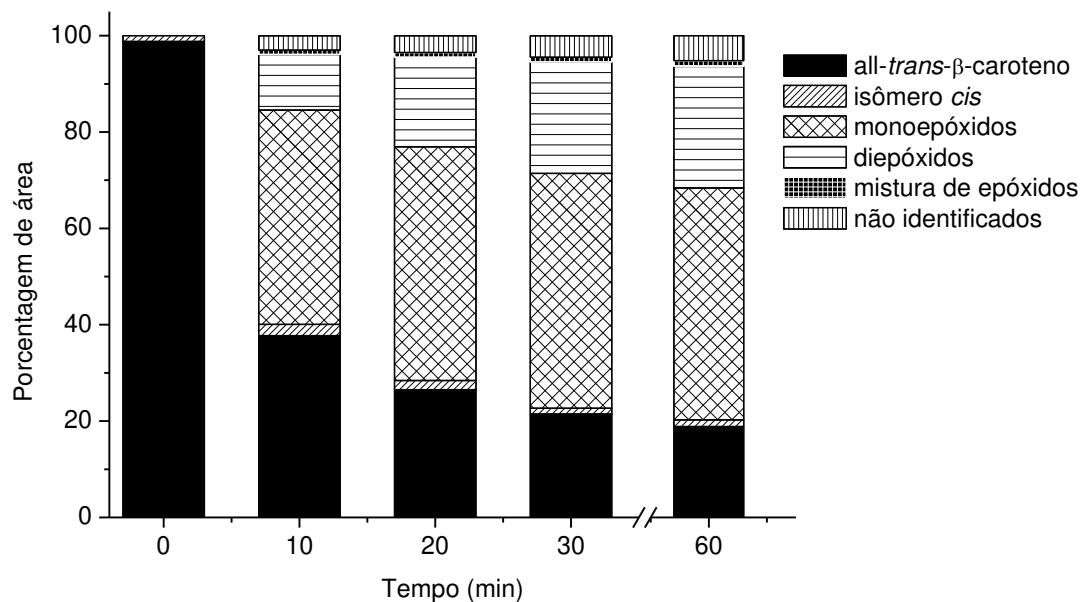


Figura 33. Distribuição, em porcentagem, de *all-trans*-β-caroteno e dos compostos formados ao longo da reação química com MCPBA.

Considerando o consumo de β-caroteno e a formação dos compostos detectados nas duas reações químicas, a Figura 34 apresenta a seqüência de reações químicas ocorridas.

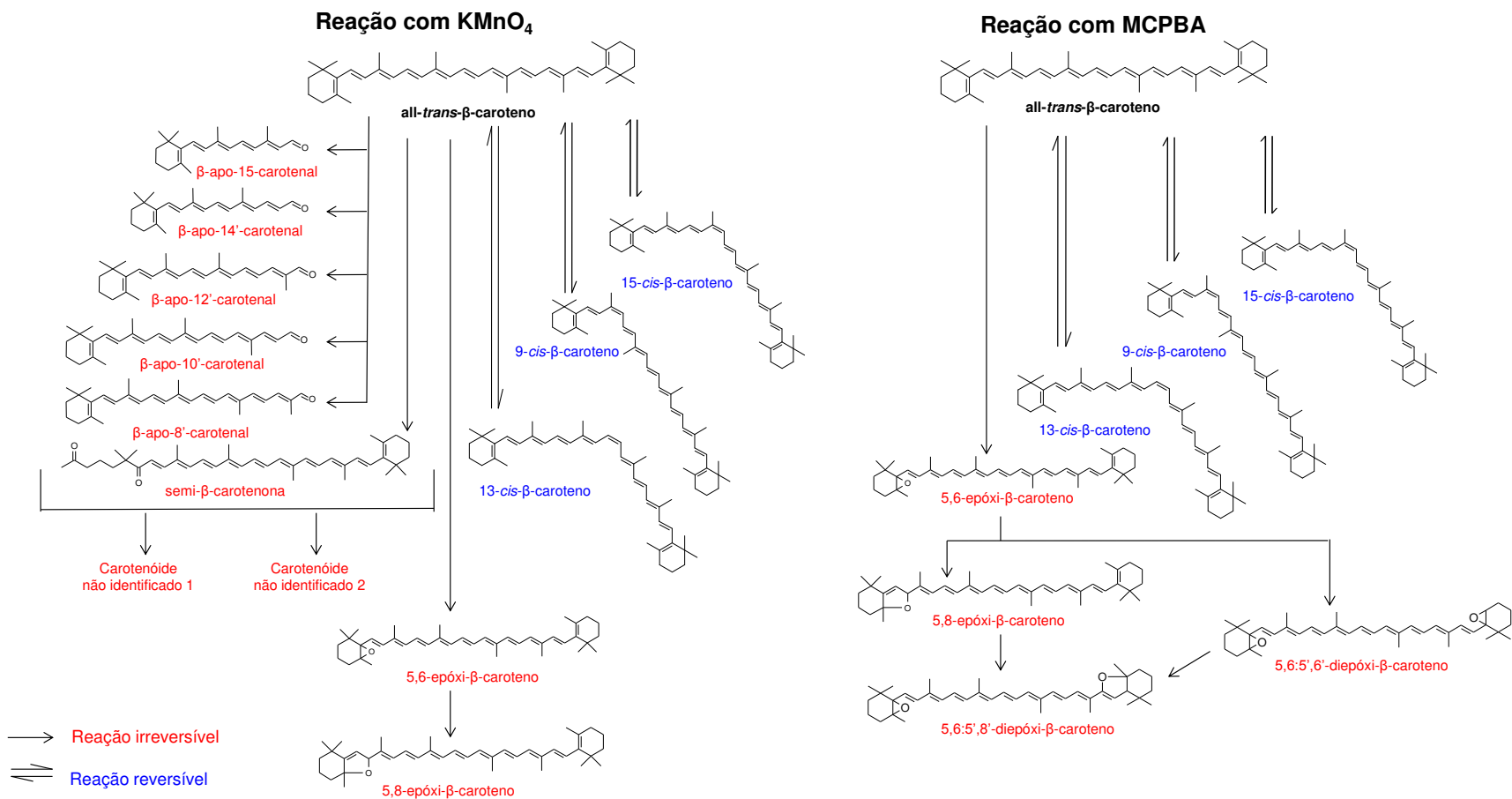


Figura 34. Seqüência de formação de produtos da degradação de  $\beta$ -caroteno via reações químicas induzidas por  $\text{KMnO}_4$  e MCPBA.

O comportamento do *all-trans*- $\beta$ -caroteno e concomitante formação dos produtos de degradação gerados em 480 minutos de reação com  $\text{KMnO}_4$  e MCPBA estão representados na Figura 35. A porcentagem de carotenóides foi calculada considerando a concentração inicial (tempo zero) como 100 %.

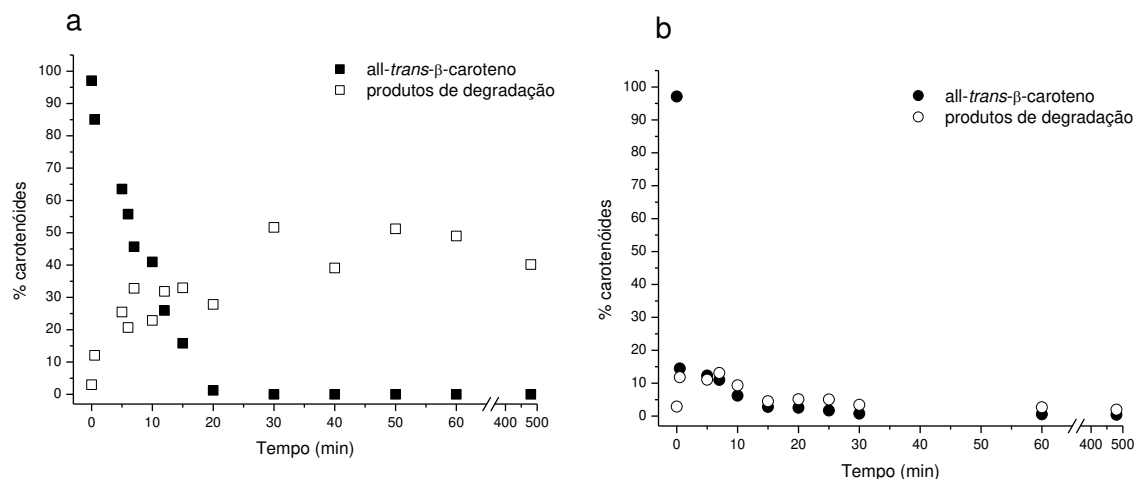


Figura 35. Porcentagem de *all-trans*- $\beta$ -caroteno e de compostos de degradação durante reação química com  $\text{KMnO}_4$  (a) e MCPBA (b).

Na reação química catalisada por  $\text{KMnO}_4$ , a maior concentração de produtos de degradação ocorreu após 30 minutos, com total degradação do *all-trans*- $\beta$ -caroteno (Figura 35 – a). A partir de 30 minutos, observou-se que os produtos de oxidação primários começaram a reagir com  $\text{KMnO}_4$ , com a formação de produtos não identificados ( $\text{ni}_1$  e  $\text{ni}_2$  - Tabela 7). Já na reação química com MCPBA ocorreu a degradação de aproximadamente 80 % de  $\beta$ -caroteno imediatamente após a adição do ácido. Porém, apenas 2% de produtos de degradação foram detectados em 480 min, sugerindo que a maior parte do  $\beta$ -caroteno é transformada em compostos voláteis. Nas duas reações químicas não foi observado período de indução, devido à forte reatividade do  $\text{KMnO}_4$  e do MCPBA.

Da mesma forma que nos experimentos com degradação térmica, provavelmente ocorreu formação de compostos secundários de oxidação com baixo peso molecular, pois mais de 50 % da quantidade total de *all-trans*- $\beta$ -caroteno degradada não foi compensada pela formação dos produtos de oxidação detectados por HPLC-DAD.

### 5.3.3 Mudanças no espectro UV-visível ocorridas durante as reações químicas do $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$ e MCPBA

A Figura 36 apresenta as mudanças ocorridas no espectro UV-visível durante a clivagem oxidativa de  $\beta$ -caroteno induzida por  $\text{KMnO}_4$ . Um aumento do efeito hipocrômico foi observado com o aumento do tempo de contato entre  $\beta$ -caroteno e  $\text{KMnO}_4$ . Entre os tempos 0 a 5 min observou-se que o  $\lambda_{\text{max}}$  permaneceu em 450 nm, porém com o aumento do tempo da reação (7 a 20 min), observou-se diminuição das bandas a 450 e 477 nm características do espectro de *all-trans*- $\beta$ -caroteno. Após 30 min de reação, o *all-trans*- $\beta$ -caroteno foi todo consumido e com isso observou-se a perda da forma inicial do espectro, diminuição do pico *cis* a 330 nm e o aparecimento de bandas a 460 nm e 470 nm. Estas novas bandas podem ser associadas à formação de alguns compostos, tais como  $\beta$ -apo-8'-carotenal ( $\lambda_{\text{max}}$  de 462 nm), semi- $\beta$ -carotenona ( $\lambda_{\text{max}}$  de 471 nm), compostos ni 1 ( $\lambda_{\text{max}}$  de 466 nm) e ni 2 ( $\lambda_{\text{max}}$  de 479 nm), que apresentam  $\lambda_{\text{max}}$  superior ao do *all-trans*- $\beta$ -caroteno.

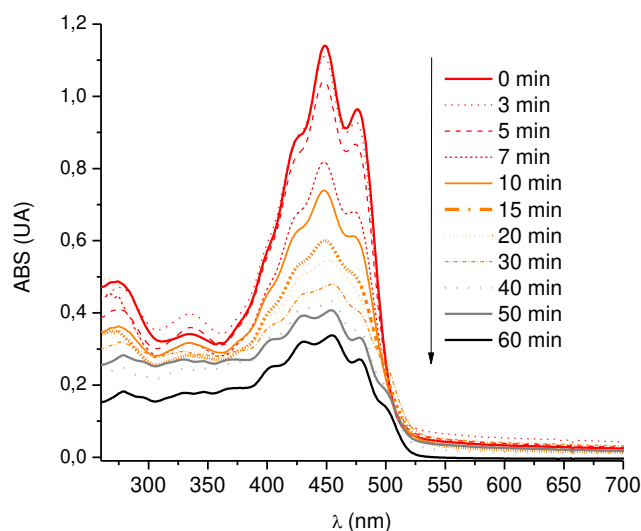


Figura 36. Espectros UV-visível monitorados durante degradação química de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$ .

Na reação de epoxidação do  $\beta$ -caroteno induzida pelo ácido MCPBA observou-se efeitos hipocrômico e hipsocrômico, além do aumento da estrutura fina no espectro UV-visível, com o aumento do tempo da reação (Figura 37). Apesar do meio reacional apresentar uma mistura de carotenóides, verificou-se que entre 20 a 60 min a estrutura

finos dos espectros aumentou, devido ao aumento da quantidade de epóxidos e da degradação total de *all-trans*- $\beta$ -caroteno, com uma forte diminuição das bandas a 450 e 477 nm. Outro fato relevante foi o aumento do efeito hipocrômico que ocorreu com o aumento do tempo da reação, indicando que foram formados produtos secundários, que não absorvem na região do UV-visível. Além disto, novas bandas em 375, 400 e 470 nm podem ser associadas à formação de alguns compostos primários, tais como 5,6:5',6'-diepóxi- $\beta$ -caroteno ( $\lambda_{\text{max}}$  de 438 nm), 5,6:5',8'-diepóxi- $\beta$ -caroteno ( $\lambda_{\text{max}}$  de 421 nm), 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno ( $\lambda_{\text{max}}$  de 445 nm), que apresentam  $\lambda_{\text{max}}$  inferior ao do *all-trans*- $\beta$ -caroteno.

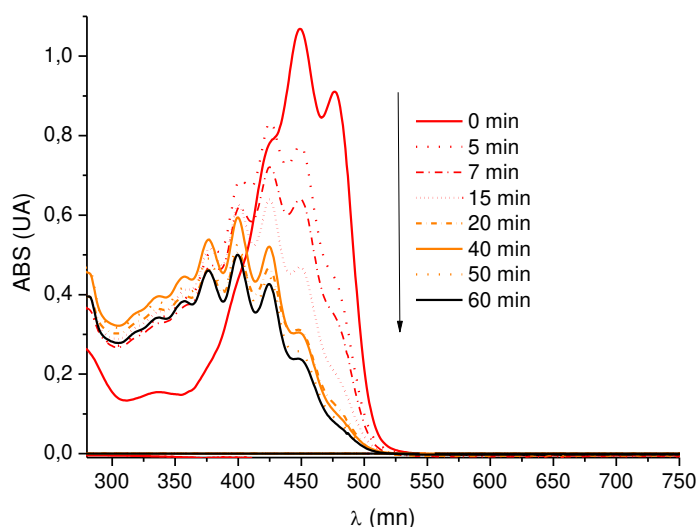


Figura 37. Espectros UV-visível monitorados durante degradação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA.

#### 5.3.4 Modificações de cor ocorridas durante a degradação química de *all-trans*- $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$

As medidas de cor foram realizadas por dois métodos, em espectrorradiômetro e em espectrofotômetro seguido de cálculo utilizando o software CromaLab<sup>®</sup>, ambos de acordo com as recomendações estabelecidas pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação).

A Figura 38 apresenta os espectros de reflexão de  $\beta$ -caroteno em diferentes tempos de reação com  $\text{KMnO}_4$ , obtidos em espectrorradiômetro. Observou-se que a



reflectância foi mínima em torno de 450 nm, devido à absorção de luz visível pelos carotenóides. Os espectros de 0 a 60 min e de 60 a 600 min apresentaram a mesma tendência de curva espectral entre 380 e 650 nm. Este comportamento está de acordo com os resultados presentes na Tabela 9, onde os parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  e  $h_{ab}$  não apresentaram grandes diferenças entre os diferentes tempos de reação, diferentemente dos dados obtidos pela análise realizada em espectrofotômetro (Tabela 10). Todos os tempos analisados se localizam dentro do primeiro quadrante, apresentando valores positivos de  $a^*$  e  $b^*$ , ou seja, uma coloração avermelhada, além de não ser possível observar mudanças relevantes entre os valores de  $b^*$  e  $C_{ab}^*$ .

Apesar da análise isoladamente do parâmetro  $a^*$  demonstrar o aumento da tonalidade vermelha devido a formação de compostos que apresentam o  $\lambda_{\max}$  superior ao  $\lambda_{\max}$  do  $\beta$ -caroteno, como  $\beta$ -apo-8'-carotenal e semi- $\beta$ -carotenona, nas condições deste método, não houve boa sensibilidade para acompanhar as mudanças de cor durante os diferentes tempos de exposição do  $\beta$ -caroteno ao  $\text{KMnO}_4$ .

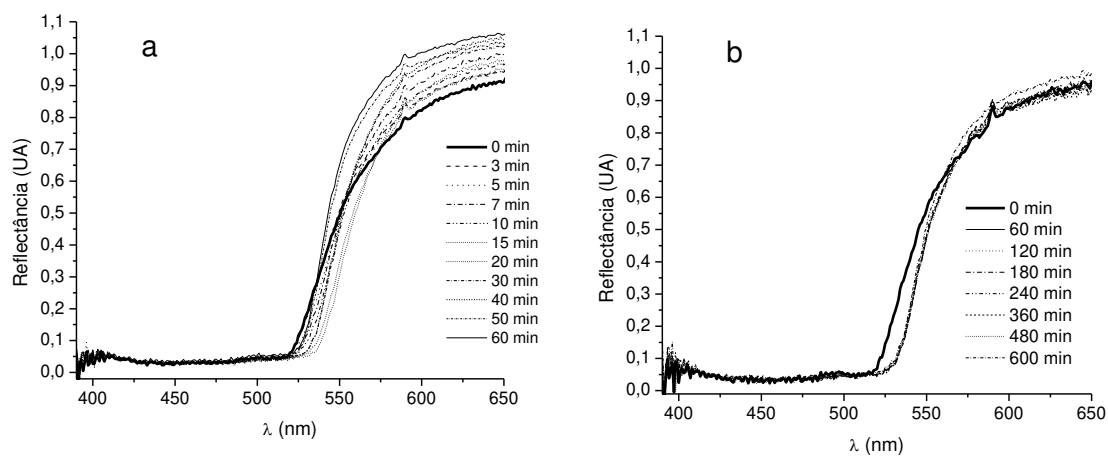


Figura 38. Espectros de reflectância obtidos durante a reação química de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$ , no tempo 0 a 60 min (a) e 0, 60 a 600 min (b).

Tabela 9. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrorradiômetro durante reação química de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$ .

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
0	73,0	36,2	89,4	96,5	68,0	0,0
3	74,0	37,3	90,9	98,2	67,6	2,1
5	73,2	39,2	89,6	97,8	66,4	3,0
7	74,4	41,7	92,5	101,5	65,7	6,4
10	72,9	42,6	89,6	99,2	64,6	6,4
15	70,2	46,6	85,5	97,4	61,4	11,4
20	70,0	49,4	85,1	98,4	59,9	14,2
30	74,4	45,2	92,3	102,8	63,9	9,5
40	74,8	41,2	88,6	97,7	65,0	5,4
50	78,1	38,7	96,4	103,9	68,1	9,0
60	77,8	37,7	95,0	102,2	68,4	7,5
120	73,4	41,4	87,3	96,6	64,6	8,4
180	73,5	41,9	87,2	96,7	64,2	8,8
240	73,5	40,6	87,6	95,7	64,8	7,5
360	73,1	40,8	85,6	94,9	64,4	8,8
480	73,1	41,5	86,2	95,7	64,2	9,0
600	73,4	41,1	86,4	95,7	64,5	8,5

Os valores dos parâmetros de cor obtidos pela análise em espectrofotômetro seguido de cálculos no software CromaLab<sup>®</sup> estão presentes nas Tabelas 10 e 11. Considerando o sistema espacial CIELAB, as características cromáticas foram localizadas dentro do segundo quadrante com valores negativos de  $a^*$  e valores positivos de  $b$ . Foi observada uma grande redução nos valores de  $b^*$  ao logo do tempo da reação, de 82,7 no tempo inicial foi para 35,0 no tempo de 60 minutos. Além disto, ao analisar o parâmetro  $a^*$  isoladamente, foi observada uma tendência de aumento na cor vermelha nos 30 primeiros, com valores de -1,7 e -1,9 em 20 e 30 min, respectivamente. Isto indica a formação principalmente de  $\beta$ -apo-8'-carotenal e semi- $\beta$ -carotenona, seguida da degradação destes compostos com o aumento do tempo de reação.

Como o  $C^*_{ab}$ , que expressa o grau de saturação da cor, foi diminuindo com o tempo de reação indicando que a intensidade de cor diminuiu com o tempo de reação. Por outro lado, o  $h_{ab}$ , que expressa a tonalidade de cor, apresentou uma diminuição inferior a  $3,0^\circ$ , entre o tempo 0 e 60 min, indicando que no meio reacional apresentou uma tonalidade amarela alaranjada. Além disto, pelo fato do meio ser translúcido, a coordenada  $L^*$  não apresentou influência durante a reação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno com

KMnO<sub>4</sub>.

A maior diferença global de cor foi observada entre os tempos 0 e 60 min ( $\Delta E^* = 48,1$ ). A oscilação da  $\Delta E^*$  no tempo de 60 min foi devido aos experimentos terem sido realizados em dias diferentes. Os valores de  $\Delta E^*$  entre 60 e 480 min (Tabela 11) apresentaram diferença menor que 2,4, comprovando também por meio deste parâmetro de cor, que a maior degradação de carotenóides ocorreu nos primeiros 60 min de reação.

Tabela 10. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro seguido de cálculo no software Cromalab<sup>®</sup> durante reação química de  $\beta$ -caroteno com KMnO<sub>4</sub>, tempos entre 0 a 60 min.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
0	91,6	-7,1	82,7	83,0	94,9	0,0
3	90,2	-7,0	79,5	79,8	95,0	3,5
5	91,5	-6,9	77,9	78,2	95,1	4,8
7	92,4	-6,3	66,1	66,4	95,4	16,6
10	93,1	-5,8	62,2	62,4	95,3	20,6
15	93,4	-3,7	53,5	53,7	94,0	29,4
20	92,5	-1,7	48,8	48,8	92,0	34,3
30	92,1	-1,9	42,3	42,3	92,6	40,7
40	95,0	-3,8	41,6	41,8	95,2	41,4
50	94,2	-3,4	37,6	37,8	95,2	45,3
60	97,3	-4,1	35,0	35,2	96,6	48,1

Tabela 11. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro seguido de cálculo no software Cromalab<sup>®</sup> durante reação química de  $\beta$ -caroteno com KMnO<sub>4</sub>, tempos 0 seguido dos tempos de 60 a 600 min.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
0	91,6	-7,1	82,7	83,0	94,9	0,0
60	96,3	-3,6	43,7	43,9	94,8	39,4
120	96,0	-3,6	42,8	43,0	94,7	40,3
180	96,3	-3,6	44,0	44,1	95,0	39,1
240	96,3	-3,4	41,6	41,7	94,8	41,5
360	96,0	-4,6	41,4	41,6	95,7	41,6
480	96,4	-3,6	46,4	46,6	95,2	36,8

Durante as medidas em espectrofotômetro, diferentes diluições foram realizadas, todas cumprindo o fundamento da Lei de Beer. A Tabela 22 - apêndice 3, apresenta os valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$ , e  $h_{ab}$  obtidos na reação de degradação com  $\text{KMnO}_4$  em função do fator de diluição. Foi possível verificar que independentemente da diluição realizada nos tempos avaliados (0, 60 120, 180, 240, 360, 480 e 600 min), as variações da cromaticidade ( $C^*_{ab}$ ) foram semelhantes entre as diluições realizadas (Figura 39).

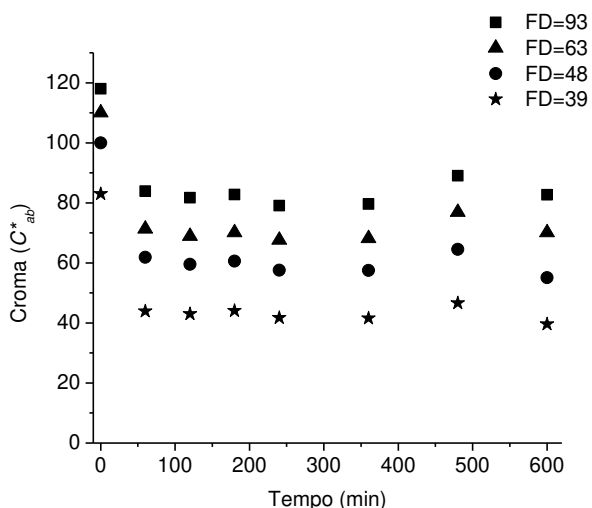


Figura 39. Parâmetro croma ( $C^*_{ab}$ ) medido em diferentes diluições realizadas durante reação química de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$  (FD = fator de diluição).

Os parâmetros de cor também foram correlacionados com os valores de absorvância a 330, 400, 425, e 450 nm (Tabela 22 - Apêndice 3). O  $C^*_{ab}$  e  $\Delta E^*_{ab}$  foram os parâmetros que apresentaram maiores coeficientes de determinação ( $R^2 > 0,96$ ) com a mistura dos compostos presentes a 450, 425 e 400 nm. Esses valores elevados de correlação foram observados devido à conversão gradual do *all-trans*- $\beta$ -caroteno em produtos primários de degradação (Figura 35).

### 5.3.5 Modificações de cor durante a degradação química de *all-trans*- $\beta$ -caroteno com MCPBA

A Figura 40 apresenta as curvas espectrais de reflectância obtidas durante reação química com MCPBA. Uma ligeira redução nas curvas espectrais com o aumento do

tempo de reação foi observada nos espectros de reflexão entre 0 e 480 min, porém, mesmo assim, todos os tempos apresentaram o mesmo formato da curva. Foi possível observar diferenças espectrais somente entre o tempo zero e 60 min, enquanto as diferenças espectrais após 60 min foram mínimas.

Segundo Francis & Clydesdale (1975), valores de  $\Delta E^*$  igual ou superior a dois indica mudanças perceptível a olho nu. Desta forma, diferenças sutis perceptíveis visualmente, indicadas pelas medidas em espectrorradiômetro, foram observadas entre o tempo zero e os tempos a partir de 5 min de degradação ( $\Delta E^*_{ab} = 3,2$ ). O  $h_{ab}$  apresentou maior diferença ( $\pm 10^\circ$ ) entre os diferentes tempos de degradação do que o parâmetro  $C^*_{ab}$ , o qual apresentou diferença de 2,7 (Tabela 12). Estes fatos indicaram que as medidas realizadas em espectrorradiômetro não apresentaram boa sensibilidade para indicar as modificações de cor que ocorreram no meio de reação com MCPBA.

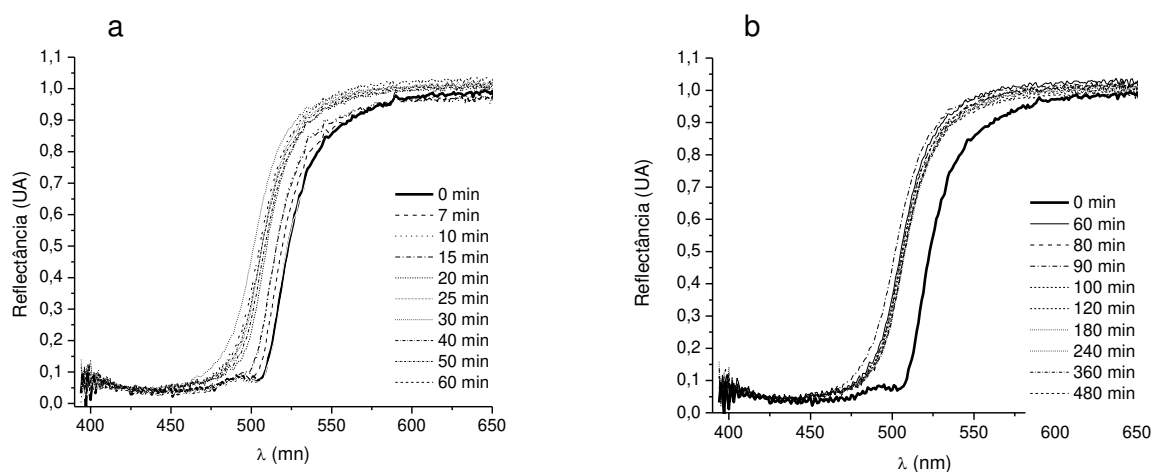


Figura 40. Espectros de reflectância obtidos durante reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA, de 0 a 60 min (a) e 0, 60 a 480 min (b).

Tabela 12. Parâmetros de cor obtidos em espectrorradiômetro durante reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
0	86,2	15,2	103,3	104,4	81,6	0
3	85,1	16,1	102,9	104,2	81,0	1,5
5	85,0	13,4	101,0	101,9	82,4	3,2
7	87,2	10,7	103,9	104,4	84,0	4,6
10	87,9	9,6	103,7	104,1	84,7	5,9
15	88,4	7,0	103,6	103,9	86,0	8,5

Continuação da Tabela 12

20	89,7	5,3	100,4	100,9	86,9	10,9
40	91,5	1,1	101,1	101,1	89,3	14,9
50	92,1	-0,2	100,7	100,7	90,1	16,7
60	93,0	-1,2	100,7	100,7	90,7	17,9
80	92,0	0,7	101,4	101,4	89,5	15,7
100	91,7	-0,2	100,2	100,2	90,1	16,6
120	92,4	0,8	101,0	101,0	90,4	15,8
180	91,6	0,8	101,2	101,2	89,5	15,5
240	91,7	0,2	100,8	100,8	89,8	16,2
360	92,2	-0,7	101,5	101,5	90,4	17,1
480	91,3	0,1	100,7	100,7	89,9	16,2

Os valores dos parâmetros de cor gerados pela análise em espectrofotômetro seguido de cálculos com o software CromaLab<sup>®</sup> estão presentes na Tabela 13. As características cromáticas se localizaram dentro do segundo quadrante com valores negativos de  $a^*$  e valores positivos de  $b^*$ , como esperado para amostras de carotenóides. Além disto, após 40 min de reação, os valores dos parâmetros de cor permaneceram sem grandes variações, pois praticamente não ocorreram mudanças no perfil de carotenóides.

A degradação do  $\beta$ -caroteno pode ser indicada pela diminuição da saturação da cor (parâmetro  $C^*_{ab}$ ). Além disto, conforme mencionado anteriormente, como ocorreu pequena variação nos valores de  $h_{ab}$ , este fato indica que não houve mudanças na tonalidade da cor que permaneceu amarelada. Pelo fato do meio ser translúcido, a coordenada  $L^*$  não apresentou influência durante a degradação de all-*trans*- $\beta$ -caroteno.

Tabela 13. Parâmetros de cor obtidos de medições em espectrofotômetro, seguido de cálculos no software CromaLab<sup>®</sup>, durante reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA.

Tempo (min)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*$
0	98,5	-6,0	26,1	26,8	103,0	0,0
5	98,3	-7,0	27,3	28,2	104,3	1,5
7	98,3	-6,4	23,5	24,4	105,1	2,6
10	99,2	-6,6	22,9	23,8	106,2	3,4
15	99,6	-5,8	18,5	19,4	107,5	7,7
20	99,1	-4,3	12,7	13,4	108,7	13,6
40	99,0	-4,5	12,5	13,3	109,7	13,7
50	99,0	-3,9	10,8	11,5	110,0	15,4

Continuação da Tabela 13

60	99,2	-3,7	10,1	10,7	110,2	16,2
80	99,0	-4,5	12,3	13,1	110,0	13,9
100	99,1	-4,3	11,7	12,4	110,1	14,6
120	99,1	-4,3	11,7	12,4	110,4	14,6
180	98,9	-4,6	12,6	13,4	109,9	13,6
240	99,3	-4,3	12,0	12,8	109,8	14,2
360	99,6	-4,4	12,2	13,0	109,8	14,1
480	99,5	-4,5	12,5	13,3	109,8	13,7

Testes com diferentes diluições também foram realizados durante as medidas efetuadas em espectrofotômetro (Tabela 23, apêndice 4). Em todas as diluições o fundamento da Lei de Beer foi cumprido e foi possível verificar que independentemente da diluição realizada as variações da cromaticidade foram semelhantes (Figura 41).

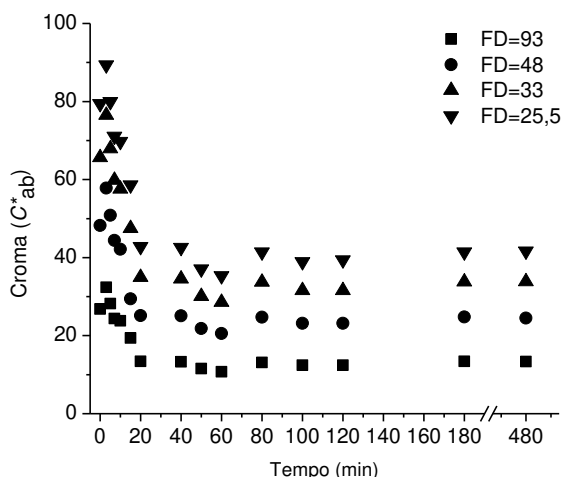


Figura 41. Parâmetro croma ( $C^*_{ab}$ ) obtido com diferentes diluições realizadas durante reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA (FD = fator de diluição).

Os parâmetros de cor correlacionados com os valores da absorbância registrados em 330, 400, 424, e 450 nm estão apresentados na Tabela 24 – Apêndice 4. Os coeficientes de determinação entre 450 nm com  $C^*_{ab}$  e com  $\Delta E^*_{ab}$  foram os mais elevados, com  $R^2$  superiores a 0,98. Devido à maior formação de monoepóxidos como produtos de oxidação, o  $R^2$  foi superior a 0,88 entre o  $C^*_{ab}$ , bem como o  $\Delta E^*_{ab}$ , e 425 nm. Por outro lado, a correlação dos parâmetros de cor com as absorbâncias a 400 e 330 nm

foi fraca, provavelmente, devido à rápida degradação de *all-trans*- $\beta$ -caroteno ao adicionar o MCPBA (Figura 34).

### 5.3.6 Atividade antioxidante dos compostos formados durante a degradação química com $\text{KMnO}_4$

A capacidade de desativação do radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  foi avaliada com a mistura de  $\beta$ -caroteno e produtos de degradação formados em cinco diferentes tempos da reação com  $\text{KMnO}_4$  (0, 10, 20, 30 e 60 min, que correspondem aos cromatogramas presentes na Figura 29), e cada tempo foi testado em no mínimo cinco concentrações diferentes. A média dos valores de TEAC juntamente com o teor de carotenóides totais, obtido pela soma da área dos picos detectados em HPLC-DAD, estão apresentados na Figura 42.

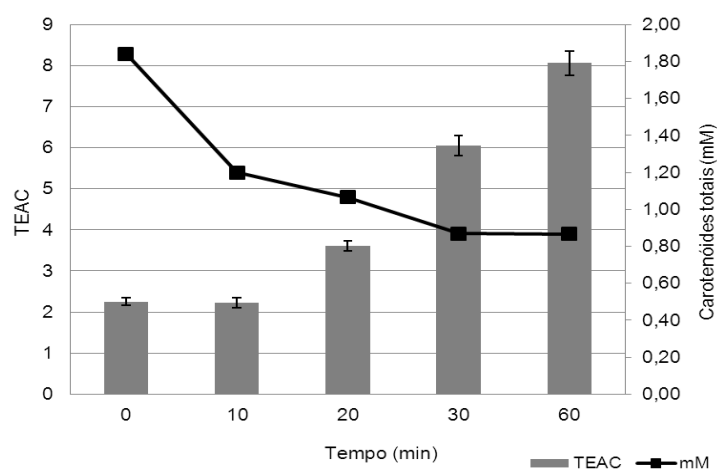


Figura 42. Capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) e concentração de carotenóides totais determinada por HPLC-DAD da mistura de  $\beta$ -caroteno e dos produtos de degradação formados em cinco tempos de reação química com  $\text{KMnO}_4$ .

No tempo zero, o *all-trans*- $\beta$ -caroteno, com aproximadamente 99 % de pureza, apresentou um TEAC médio de 2,3, valor semelhante ao encontrado no tempo zero dos experimentos com degradação térmica e ao reportado por Re et al. (1999) para o padrão de  $\beta$ -caroteno. Nos 10 primeiros min da clivagem oxidativa, o  $\beta$ -caroteno (soma dos isômeros *cis* e *trans*) foi majoritário (60,7 %) e um valor de TEAC muito semelhante ao



tempo zero (2,4) foi observado, enquanto que com o decorrer da reação o TEAC foi aumentando, chegando em 60 min a um valor 3,0 vezes maior quando comparado ao tempo zero. Esse aumento na capacidade de reduzir o radical ABTS<sup>•+</sup> é devido às mudanças estruturais da molécula de  $\beta$ -caroteno, a qual durante a clivagem oxidativa sofreu (i) introdução de oxigênio na estrutura, (ii) alteração no número de ligações duplas conjugadas, (iii) formação de um secocarotenóide e (iv) e formação de compostos não identificados com longo sistema de ligações duplas conjugadas. Outra consideração importante é que essas análises foram realizadas com a mistura reacional, imediatamente após a clivagem oxidativa e que os produtos gerados não foram previamente purificados para a avaliação da capacidade antioxidante devido à baixa estabilidade que apresentam. Como o potencial antioxidante da mistura destes carotenóides ainda não foi relatado na literatura, e os picos ni 1 e ni 2 não foram identificados, os resultados obtidos para a atividade desativadora do radical ABTS<sup>•+</sup> foram comparados com alguns carotenóides analisados separadamente. Mueller & Boehm (2011) observaram que compostos que apresentam oxigênio, como o  $\beta$ -apo-8'-carotenal e o etil éster do ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenóico, não perderam totalmente a capacidade antioxidante, mas esta não foi superior a do padrão de  $\beta$ -caroteno.

Além da avaliação da capacidade desativadora de um radical estável (ABTS<sup>•+</sup>), também foi avaliada a capacidade de proteção contra o  $^1\text{O}_2$ , uma vez que os carotenóides são eficientes desativadores desta espécie reativa, com cerca de 95 % da desativação do  $^1\text{O}_2$  sendo física e os 5 % restantes desativados quimicamente (Palace et al., 1999). Para esta metodologia, quatro diferentes concentrações de carotenóides em cada tempo da reação química foram utilizadas para o cálculo do IC<sub>50</sub>, que é concentração de antioxidante necessária para que se obtenha 50 % de proteção, calculada pelos ajustes lineares obtidos nas curvas de % proteção *versus* concentração de carotenóides totais em  $\mu\text{g/mL}$ .

Os resultados obtidos mostraram que os valores de IC<sub>50</sub> variaram de 1,84 a 4,94  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 13), e com o aumento do tempo de reação o valor de IC<sub>50</sub> foi diminuindo. Este fato indica que a atividade frente ao  $^1\text{O}_2$  apresentada pela mistura aumentou com o decorrer da reação de clivagem oxidativa. Por outro lado, Chisté (2011) encontrou um valor superior de IC<sub>50</sub> para o padrão de  $\beta$ -caroteno (9,1  $\mu\text{g/mL}$ ) se comparado ao valor do tempo zero obtido neste experimento (4,94  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 14. IC<sub>50</sub> (μg/mL) da mistura de β-caroteno e dos produtos de oxidação formados em cinco tempos da reação química com KMnO<sub>4</sub>.

Tempo (min)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
0	4,94 ± 0,46
10	2,39 ± 0,20
20	2,95 ± 0,26
30	2,17 ± 0,11
60	1,84 ± 0,10

Assim, os resultados obtidos nos estudos de capacidade antioxidante não variaram em função da espécie reativa utilizada, isto é do mecanismo de ação antioxidante, transferência de elétrons para ABTS<sup>•+</sup> e de energia entre <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e o carotenóide. De forma geral, pode-se afirmar que os produtos de oxidação provenientes do β-caroteno apresentaram maior capacidade em desativar o radical ABTS<sup>•+</sup> e de proteção contra o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quando comparados ao carotenóide de origem (*all-trans*-β-caroteno), provavelmente devido à incorporação de pelo menos um átomo de oxigênio na estrutura.

## 6 Conclusões

Foram identificados, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas, 16 produtos derivados da degradação térmica e química de  $\beta$ -caroteno.

O aquecimento a 120 °C na presença de ar por 40 minutos, sob fluxo de oxigênio por 30 minutos e a 150 °C durante 10 minutos na presença de ar e 4 minutos sob fluxo de oxigênio degradaram mais de 75 % do teor inicial de *all-trans*- $\beta$ -caroteno, em sistema-modelo. Por outro lado, no sistema com fluxo de nitrogênio, ocorreu degradação de 50 % de *all-trans*- $\beta$ -caroteno somente após 180 min a 150 °C. Adicionalmente, o aquecimento com adição do galato de propila a 120 °C na presença de ar diminuiu a auto-catálise do *all-trans*- $\beta$ -caroteno.

A degradação térmica promoveu a formação de isômeros *cis* (13-*cis*, 15-*cis* e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno), di-*cis* (9,15-*cis*, 9,13-*cis* e 13,15-*cis*- $\beta$ -caroteno), epóxidos (5,6 e 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno) e apocarotenóides ( $\beta$ -apo-12',  $\beta$ -apo-10' e  $\beta$ -apo-8'-carotenal). Entre os compostos de degradação, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno foi o isômero *cis* majoritário em todos os sistemas de aquecimento, com exceção do sistema-modelo a 150 °C com fluxo de nitrogênio, no qual o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno foi detectado em maior quantidade. Em todos os sistemas-modelo com degradação térmica produtos de oxidação foram encontrados em baixa concentração. Com isso, conclui-se que a velocidade de degradação do  $\beta$ -caroteno está diretamente relacionada às condições do ambiente e do próprio meio.

A degradação química, a clivagem oxidativa com  $\text{KMnO}_4$  ocasionou a degradação total de *all-trans*- $\beta$ -caroteno com a concomitante formação de apocarotenóides ( $\beta$ -apo-15,  $\beta$ -apo-14',  $\beta$ -apo-12',  $\beta$ -apo-10' e  $\beta$ -apo-8'-carotenal), secocarotenóide (semi- $\beta$ -carotenona), isômeros *cis* (13-*cis*, 15-*cis* e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno), epóxidos (5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e mistura de mono-epóxido e diepóxido) e dois compostos não identificados. Com o aumento do tempo de reação,  $\beta$ -apo-8'-carotenal e semi- $\beta$ -carotenona foram os produtos majoritários identificados.

Na epoxidação com MCPBA, a degradação de *all-trans*- $\beta$ -caroteno não foi completa, havendo formação de 5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno, 5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*-5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno, diepóxidos (5,6:5',6', 5,6:5',8'diepóxi- $\beta$ -caroteno) e isômeros *cis* (13-*cis* e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno). Ambas as reações químicas foram eficientes para gerar compostos

primários da oxidação de carotenóides, os quais durante os experimentos com aquecimento térmico foram detectados em quantidades muito pequenas. Na degradação química ocorreu maior formação de compostos primários da oxidação de carotenóides do que na degradação térmica.

A avaliação das mudanças de cor em sistema-modelo com  $\beta$ -caroteno em solução e durante reações químicas induzidas mostrou que todas as condições avaliadas apresentaram boas correlações entre carotenóides totais e as variáveis  $b^*$  e  $C^*_{ab}$ . Enquanto as análises realizadas em espectrorradiômetro não apresentaram boa sensibilidade para avaliar modificações de cor durante a degradação de carotenóides.

A capacidade antioxidante, medida tanto pela desativação do radical  $ABTS^{\bullet+}$  como proteção contra o  $^1O_2$ , indica que os produtos de degradação apresentaram a mesma capacidade antioxidante que o *all-trans*- $\beta$ -caroteno. Por outro lado, na degradação química, os produtos obtidos através da clivagem oxidativa apresentaram maior capacidade em desativar o radical  $ABTS^{\bullet+}$  e na desativação do  $^1O_2$  em relação ao *all-trans*- $\beta$ -caroteno.

## 7 Referências Bibliográficas

- Achir, N.; Randrianatoandro, V. A.; Bohuon, P.; Laffargue, A.; Avallone, S. Kinetic study of  $\beta$ -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 112:349-361, 2010.
- Ahmed, U.S.; Shivare, U.S.; Sandhu, K.S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. **Journal of Food Science**, 67:2692-2695, 2002.
- 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  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53:9512-9518, 2005.
- Ambros, M. L. Von; Schuch, C. M. Ativação do peróxido de hidrogênio para a epoxidação de olefinas não-funcionalizadas. **Química Nova**, 20:58-71, 1997.
- 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.
- 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.
- Barua, A. B. Intestinal absorption of epoxy- $\beta$ -carotenes by humans. **Biochemical Journal**, 339:359-362, 1999.
- Bechoff, A.; Dhuique-Mayer, C.; Dornier, M.; Tomlins, K. I.; Boulanger, R.; Dufour, D.; Westby, A. Relationship between the kinetics of  $\beta$ -carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips. **Food Chemistry**, 121:348-357, 2010.
- Benevides, C. M. J.; Veloso, M. C. C.; Pereira, P. A. P.; Andrade, J. B. A chemical study of  $\beta$ -carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products. **Food Chemistry**, 126:927-934, 2011.
- Berset, C.; Marty, C. Formation of nonvolatile compounds by thermal degradation of  $\beta$ -carotene: protection by antioxidants. **Methods in Enzymology**, 213:129-142, 1992.

- Bohm, F.; Edge, R.; McGarvey, D. J.; Truscott, T. G.  $\beta$ -carotene with vitamins E and C offer synergistic cell protection against NO<sub>x</sub>. **FEBS Letters**, 436:387-389, 1998.
- Bohm, V.; Puspitasari-Nienaber, N. L.; Ferruzzi, M. G.; Schwartz, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 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.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Carotenoids. Handbook. Birkhäuser, Basilea, Suiza, 2004.
- Brunner, M. R. Thermische (*E/Z*)-isomerisierung von carotinoiden. Inauguraldissertation der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der University of Bern. 135 p., 1997.
- Burke, S. D.; Danheiser, R. L. Oxidizing and reducing agents - handbook of reagents for organic synthesis. Wiley & Sons Ltda, London, UK, p. 84-89, 1999.
- Burton, G. W.; Ingold, K. U.  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid anti-oxidant. **Science**, 224:569-573, 1984.
- 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, p. 177-192, 2008.
- Caris-Veyrat, C. Formation of carotenoid Oxygenated cleavage products. In: Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties. Ed: John T. Landrum. CRC Press, U.S, 2010.
- Caris-Veyrat, C.; Amiot, M-J; Ramasseul, R.; Marchon, J-C. Mild oxidative cleavage of  $\beta$ -carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates. **New Journal Chemistry** 25:203-206, 2001.
- Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Böhm, V. Cleavage products of lycopene produced by *in vitro* oxidations: characterization and mechanisms of formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51:7318-7325, 2003.
- Chandler, L. A.; Schwartz, S. J. Isomerization and losses of all-*trans*- $\beta$ -carotene in sweet

- potatoes as affected by processing treatments. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 36:129-133, 1988.
- Chen, B. H.; Chen, T. M.; Chien, J. T. Kinetic model for studying the isomerization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene during heating and illumination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42:2391-2397, 1994.
- Chen, B. H.; Huang, J. H. Degradation and isomerization of chlorophyll *a* and  $\beta$ -carotene as affected by various heating and illumination treatments. **Food Chemistry**, 62:299-307, 1998.
- Chen, B. H.; Peng, H. Y.; Chen, H. E. Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43:1912-1918, 1995.
- Chichester, C. O; McFeeters, R. Pigment degeneration during processing and storage. The biochemistry of fruits and their products, Academic Press, London. 1971.
- Chisté, R. C. Aplicação da extração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e corantes presentes em urucum e Piquiá. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 105 p., 2011.
- Cie (2004). Colorimetry. (3rd ed.). Viena, Austria. Technical Report CIE 15.2.
- Cole, E.R.; Kapur, N. S. The stability of lycopene. I. Degradation by oxygen. **Journal Science Food Agriculture**, 8:360-365, 1957.
- Conn, P. F; Schalch, W.; Truscott, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 11:41-47, 1991.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4 ed. Tradução Adriano Brandelli et al. Porto Alegre: Artmed, 900 p., 2010.
- 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, 342 p., 2003.
- Devasagayam, T. A.; Werner, T.; Ippendorf, H.; Martin, H-D.; Sies, H. Synthetic carotenoids novel polyene polyketone and new capsorubin isomers as efficient quenchers of single molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 55:511-514, 1992.
- Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, A. J.

- Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 4209-4216, 2007.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen desativador. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 274:532-538, 1989.
- Edge, R.; El-Agamey, A.; Land, E. J.; Navaratnam, S.; Truscott, G. Studies of carotenoids one-eletron reduction radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 458:104-110, 2007.
- El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; Mcgarvey, D. J.; Mortensen, A.; Philip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 430:37-48, 2004.
- El-Agamey, A.; Mcgarvey, D. J. Evidence for a lack of reactivity of carotenoids addition radicals towards oxygen: a laser flash photolysis study of the reactions of carotenoids with acylperoxyl radicals in polar and non-polar solvents. **Journal of the American Chemical Society**, 125:3330-3340, 2003.
- Emenhiser, C.; Simunovic, N.; Sander, L. C.; Schwartz, S. J. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C<sub>30</sub> 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.
- Faria, A. F.; Mignone, R. A.; Montenegro, M. A.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58:8004-8011, 2010.
- Fatiadi, A. J. The classical permanganate ion: a novel antioxidant in organic chemistry. **Synthesis** 85:85–127, 1987.
- Ferreira, J. E. M.; Rodriguez-Amaya, D. B. Degradation of lycopene and  $\beta$ -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. **Journal Food Science**, 78:589-594, 2008.



- Foote, C. S.; Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. **Journal of the American Chemical Science**, 90:6233-6235, 1968.
- Francis, J.F.; Clydesdale, F.M. Food colorimetry, theory and application. New York: Van Nostrand Reinhold/AVI. 1975.
- Fraser, P. D.; Bramley, P. M.; The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, 43:228-265, 2004.
- Gaier, K.; Angerhofer, A.; Wolf, H. C. The lowest excited singlet states of all-*trans*- $\beta$ -carotene single crystals. **Chemical Physics Letters**, 187:103-109, 1991.
- Gradelet, S.; Leclerc, J.; Siess, M.H.; Astorg, P.  $\beta$ -apo-8-carotenal, but not  $\beta$ -carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat. **Xenobiotica**, 26:909–919, 1996.
- Gross, J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. AVI Bokk. United States of America. 349 p., 1991.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, New York, 2007.
- Hamama, A. A.; Nawar, W. W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39:1063-1069, 1991.
- Handelman, G. J.; Van Kuijk, F. J. G. M.; Chatterjee, A; Krinsky, N. Characterization of products formed during the autoxidation of  $\beta$ -carotene. **Free Radical Biology & Medicine**, 10:427-437, 1991.
- 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.
- Henry, K. L.; Puspitasari-Nienaber, L.; Jarén-Galán, M.; Breemen, R. B. van; Catignani, G. L.; Schwartz, S. J. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous models system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 5008-5013, 2000.
- Henry, L. K.; Catignanai, G. L.; Schwartz, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and all-*trans*  $\beta$ -carotene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 75: 823- 829, 1998.
- Heredia, F.J.; Álvarez; C.; González-Miret, M.L.; Ramírez, A. CromaLab, análisis de color. Registro de la propiedad intelectual, SE-1052-04, Sevilla, 2004.
- Hirayama, O.; Nakamura, K.; Hamada, S.; Kobayasi, Y. Singlet oxygen quencher ability of natural occurring carotenoids. **Lipids**, 29:149-150, 1994.

- 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  $\beta$ -carotene to cultured human cells. **Experimental Eye Research**, 81:239-243, 2005.
- Jiménes-Escrig, A.; Jiménez-Jiménez, I.; Sánchez-Moreno, C.; Saura-Calixto, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2-2-diphenil-1-picrylhydrazyl. **Journal Science Food Agriculture**, 80:1686-1690, 2000.
- 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.
- Kanasawud, P.; Crouzet, J. C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous médium. Lycopene degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38:1238-1242, 1990.
- Karrer, P.; Jucker, E. Terpene epoxides., **Helvetica Chimica Acta**, 28:427-436,1945.
- Karrer, P.; Solmssen, U.  $\beta$ -Carotinal, ein Abbauprodukt des  $\beta$ -Carotins **Helvetica Chimica Acta**, 30:682-690, 1937.
- Khachik, F.; Beecher, G.R.; Lusby, W.R. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 37:1465-1473, 1989.
- Khachik,F.; Steck, A.; Niggli, U. A.; Pfander, H. Partial synthesis and structural elucidation of the oxidative metabolites of lycopene identified in tomato paste, tomato juice, and human serum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46:4874-4882, 1989.
- Kim, L. I.; Lee, J. H.; Choi, D. S.; Won, B. M.; Jung, M. Y.; Park, J. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by common synthetic antioxidants (tert-tylhydroxyanisol, tert-di-Butydroxytoluene, and tert-butylhydroquinone) as compared with  $\alpha$ -tocopherol. **Journal Food Science**, 74:362-369, 2009.
- Kiokias, S.; Oreopoulou, V. Antioxidant properties of natural carotenoid preparations against the AAPH-oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**,7:132-139, 2006.

- Lacker, T.; Strohschein, S.; Albert, K. Separation and identification of various carotenoids by C<sub>30</sub> reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 854:37-44, 1999.
- Lee, H. S.; Coates, G. A. Effect of thermal pasteurization on valencia orange juice color and pigments. **LWT**, 36:153-156, 2003.
- Lieber, D. C.; Kennedy, T. A. Epoxide products of  $\beta$ -carotene antioxidant reactions. Carotenoids. Part A chemistry, separations, quantitation and antioxidant. In: Methods in enzymology. Ed: Lester Packer, Academic Press Inc. San diego, EUA, 213:472-479, 1992.
- Liu, M. H.; Chen, B. H. Relationship between chlorophyll *a* and  $\beta$ -carotene in a lipid-containing model system during heating. **Food Chemistry**, 61:41-47, 1998.
- Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E.; Negueruela, A. I. Note. Visual and Instrumental color evaluation in red wines. **Food Science Technology International**, 7:439-445, 2001.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation of *trans*- $\beta$ -carotene during heating in sealed glass tubes and extrusion cooking. **Journal Food Science**, 51:698-702, 1986.
- Marty, C.; Berset, C. Degradation products of *trans*- $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. **Journal Food Science**, 53:1880-1886, 1988.
- Marty, C.; Berset, C. Factor affecting the thermal degradation of all-*trans*- $\beta$ -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38: 1063-1067, 1990.
- Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of thermal processing on *trans-cis*-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. **Food Chemistry**, 83:609-617, 2003.
- Meléndez-Martínez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Relationship between the colours and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, 101:1145-1150, 2007.
- Meléndez-Martínez, A.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51:7266-7270, 2003.
- Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Yebra, A.; Huertas, R.; Hita, E. Algunas reflexiones y recientes recomendaciones internacionales sobre evaluación de diferencias de color. **Óptica Pura y Aplicada**, 34:1-10, 2001.
- 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, p. 213-240, 2008.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, 84:407-412, 1993.
- 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.
- Mínguez-Mosquera, M. I. Clorofilas y carotenoides em tecnologia de alimentos. Serie Ciencias, n. 47. Secretariado de Publicações de la Universidad de Sevilla, España, 189 p., 1997.
- Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 75:353-361, 2002.
- Montenegro, M. A.; Rios, A.; Mercadante, A. Z.; Nazareno, M. A.; Borsarelli, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52:367-373, 2004.
- Mueller, L.; Boehm, V. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene compounds in different *in vitro* assays. **Molecules**, 16:1055-1069, 2011.
- Nunes, I.; Mercadante, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24:440-447, 2004.
- O'Sullivan, L.; Galvin, K.; Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Effects of cooking on the profile and micellarization of 9-*cis*, 13-*cis* and all-*trans*- $\beta$ -carotene in green vegetables. **Food Research International**, 43:1130-1135, 2010.
- Oualja, H. E.; Perrin, D.; Martin, R. Kinetic study of the thermal oxidation of all-*trans*- $\beta$ -carotene and evidence for its antioxygen properties. **New Journal Chemistry**, 19:863-872, 1995.
- Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. Q. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 26:746–761, 1999.
- Palozza, P.; Serini, S.; Ameruso, M.; Verdecchia, S. Modulation of intracellular signalling cap.11, In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (2009). **Carotenoids, v. 5: Nutrition and Health**. Handbook. Birkhäuser, Basilea, Suiza. 211-230 p.
- Pérez-Conesa, D.; García-Alonso, J.; García-Valverde, V.; Iniesta, M-D.; Jacob, K.;

- Sánchez-Siles, S. M.; Ros, G.; Periago, M. J. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, 10:179-188, 2009.
- Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, 39:791-800, 2006.
- Qiu, D.; Chen, Z-R.; Li, H-R. Effect of heating on solid  $\beta$ -carotene. **Food Chemistry**, 112:344-349, 2009.
- Qiu, D.; Chen, Z-R.; Li, H-R. Density functional theory study on thermal isomerization of  $\beta$ -carotene. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, 865: 44-48, 2008.
- 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.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27:771-780, 2004.
- Ribeiro, W. C. V. Identificação e capacidade antioxidante de compostos de degradação de carotenóides. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 66 p., 2011.
- Rietjens, M. C. M.; Boersma, M-G.; Haan, L. de; Spenkeliink, B.; Awad, H. M.; Cnubben, N. H. P.; Zanden, J. J. V.; Woude, H. V. Der; Alink, G. M.; Koeman, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidant vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11:321-333, 2002.
- Rios, A. O., Borsarelli, C., Mercadante, A. Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 2307-2311, 2005.
- Rodriguez, E. B.; Rodriguez-Amaya, D. B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from  $\beta$ -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-lycopenals 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.
- Salgo, M. G.; Cueto, R.; Winston, G. W.; Pryor, W. A. Beta carotene and its oxidation products have different effects on microsome mediated binding of benzo[a]pyrene to DNA, **Free Radical Biology Medicine**, 26:162, 1999.
- Sommerburg, O.; Langhans, C.-D.; Arnhold, J.; Leichenring, M.; Salerno, C.; Crifo, C.; Hoffmann, G. F.; Debatin, K-M.; Siens, W. G.  $\beta$ -carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid – a model for neutrophil-derived degradation. **Free Radical Biology** 35:11480-1490, 2003.
- Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, 24:345-351, 2003.
- 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.
- Stratton, S. P.; Schaefer, W. H.; Liebler, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. **Chemical Research in Toxicology**, 6:542-547, 1993.
- Strohschein, S.; Pursch, M.; Albert, K. Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of  $\beta$ -carotene isomers employing a C<sub>30</sub> stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 21:669-677, 1999.
- Thomas, J. H.; Drake, J. M.; Paddock, J. R.; Conklin, S.; Johnson, J.; Seliskar, C. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Characterization of ABTS at a polymer-modified electrode. **Electroanalysis**, 16:547-555, 2004.
- Tibaduiza, E. C.; Fleet, J. C.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I. Excentric cleavage products of  $\beta$ -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.
- Woodal, A. A.; Lee, S. W-M; Weesie, R. J.; Jackson, M. J.; Britton, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **BBA**, 1336:33-42, 1997.
- Yamauchi, R.; Miyske, N; Inoue, H.; Kato, K. Products formed by peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41:708-713, 1993.
- Yeh, S. L.; Hu, M. L., Oxidized [beta]-carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549, **Food Chemistry Toxicology**, 41:1677, 2003

- Young, A. J.; Lowe, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385:20-27, 2001.
- Zechmeister, L. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. **Chemical Reviews**, 34:267-344, 1944.
- 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.
- 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.
- Ztircher, M.; Pfander, H. Oxidation of carotenoids - II: Ozonides as products of the oxidation of canthaxanthin. **Tetrahedron**, 55:2307-2310, 1999.

## 8 APÊNDICE



## 8.1 Apêndice 1

Tabela 15. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  em presença de ar.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	Mistura de epóxidos	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ produtos de oxidação	$\Sigma$ produtos de degradação	Carotenóides totais
0	< lq	< lq	< lq	< lq	< lq	5,92	< lq	550,89	< lq	< lq	5,92	556,81
5	< lq	< lq	1,81	< lq	0,78	5,10	< lq	530,34	0,38	1,81	8,07	538,41
15	< lq	< lq	3,38	0,25	0,36	3,66	0,68	476,26	0,14	4,31	8,46	484,73
17	0,19	0,30	4,59	1,07	1,00	5,34	0,79	431,22	0,62	6,93	13,88	445,10
20	0,16	0,31	4,52	0,98	0,94	5,13	0,55	433,64	0,74	6,52	13,33	446,98
26	0,11	0,20	4,87	0,79	0,83	6,48	0,59	370,01	0,95	6,55	14,81	384,83
30	0,58	0,50	4,70	0,62	1,14	5,92	0,68	287,69	0,57	7,07	14,70	302,39
35	0,35	0,47	3,33	0,54	0,59	4,78	0,46	144,84	0,53	5,14	11,05	155,89
38	0,50	0,28	3,82	0,23	1,04	5,94	0,64	145,48	0,64	5,48	13,10	158,58
40	0,39	0,27	2,42	0,16	0,89	3,96	0,23	85,42	1,21	3,48	9,54	94,97

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

Tabela 16. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $120\text{ }^\circ\text{C}$  com sob fluxo de oxigênio.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	mistura de epóxidos	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ produtos de oxidação	$\Sigma$ produtos de degradação	Carotenóides totais
0	< lq	< lq	1,36	0,51	2,07	5,80	493,18	7,68	9,75	502,93
1	< lq	< lq	1,08	1,08	1,92	2,59	495,17	4,74	6,66	501,83
3	< lq	< lq	1,55	2,39	1,64	0,93	470,09	4,88	6,52	476,61
5	< lq	< lq	3,31	1,31	1,04	0,53	355,90	5,15	6,19	362,09
6	< lq	< lq	4,09	1,50	0,69	0,62	307,25	6,21	6,90	314,15
7	0,31	0,31	3,64	1,58	0,80	0,52	315,52	6,36	7,16	322,68
8	0,14	0,20	3,79	0,86	0,56	0,37	214,77	5,36	5,91	220,68
10	0,11	0,19	3,07	1,15	0,31	0,36	208,02	4,88	5,19	213,22
11	0,14	0,09	2,77	0,70	0,31	0,34	168,07	4,05	4,36	172,43
12	< lq	< lq	1,80	0,52	0,41	0,21	110,71	2,53	2,94	113,64
15	0,08	0,20	4,56	1,12	0,45	0,64	238,65	6,60	7,04	245,70
25	0,05	0,10	3,85	0,73	0,26	0,33	105,51	5,06	5,33	110,83
30	< lq	< lq	2,44	0,74	0,23	0,18	77,35	3,36	3,59	80,94

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100\text{ mL}$ .

Tabela 17. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  em presença de ar com galato de propila.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -carotene	Mistura de epóxidos	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ produtos de oxidação	$\Sigma$ produtos de degradação	Carotenóides totais
0	0,12	0,11	0,47	1,70	0,74	9,96	0,51	0,03	613,90	0,57	2,43	14,20	628,10
5	0,24	0,21	0,55	1,59	1,13	8,79	0,62	0,06	532,07	1,95	2,64	15,13	547,20
10	0,38	0,35	2,05	1,45	3,47	20,10	0,98	0,31	627,13	3,52	4,55	32,61	659,73
20	0,43	0,35	0,46	1,82	0,78	6,34	0,69	0,69	478,32	1,31	3,75	12,87	491,19
25	0,36	0,33	0,46	1,74	0,69	5,89	0,54	0,43	403,16	1,64	3,33	12,09	415,24
30	0,47	0,47	0,53	2,35	0,96	7,63	0,65	0,62	472,33	2,14	4,44	15,82	488,16
35	0,53	0,44	0,52	2,47	0,95	7,28	0,71	0,43	471,62	2,18	4,40	15,52	487,15
40	0,51	0,43	0,32	2,35	0,54	5,81	0,57	0,67	412,48	1,57	4,28	12,78	425,26
50	0,49	0,60	0,52	2,43	0,84	6,99	0,62	0,60	379,92	2,64	4,63	15,71	395,64
60	0,59	0,57	0,46	0,24	0,74	5,42	0,45	0,58	334,16	1,48	2,43	10,53	344,69
65	0,51	0,47	0,42	2,00	0,76	5,59	0,38	0,56	261,08	1,57	3,95	12,25	273,33
70	0,61	0,51	0,49	1,54	0,71	5,03	0,36	0,51	238,76	0,11	3,66	9,86	248,61
75	0,49	0,46	0,44	1,47	0,62	4,36	0,33	0,73	238,26	0,86	3,58	9,75	248,01
80	0,55	0,53	0,44	2,27	0,77	4,70	0,48	0,65	240,63	0,95	4,45	11,34	251,97
90	0,53	0,52	0,36	2,43	0,75	5,58	0,38	0,36	209,06	1,79	4,20	12,70	221,76
95	0,50	0,49	0,48	2,25	0,77	4,69	0,35	0,40	225,16	1,24	4,13	11,18	236,33
100	0,36	0,34	0,35	1,57	0,59	3,47	0,19	0,38	159,23	0,56	3,02	7,82	167,05
105	0,23	0,18	0,27	0,46	0,64	2,95	< lq	< lq	80,66	0,62	1,14	5,35	86,02

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

Tabela 18. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  em presença de ar.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	$\beta$ -apo-8'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	Mstura de epóxidos	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ produtos de oxidação	$\Sigma$ produtos de degradação	Carotenóides totais
0	< lq	< lq	< lq	< lq	< lq	< lq	9,95	< lq	< lq	< lq	658,86	< lq	< lq	< lq	9,95	668,81
1	< lq	< lq	< lq	1,53	0,17	1,28	10,86	0,25	0,60	< lq	630,68	1,03	< lq	1,70	15,72	646,41
3	0,32	0,33	< lq	3,45	6,51	12,44	51,58	< lq	1,85	< lq	421,36	12,00	0,60	10,61	89,07	510,43
4	0,92	0,39	< lq	3,34	6,97	13,47	58,87	< lq	3,49	0,27	390,58	18,46	1,07	11,88	107,24	497,82
5	1,41	0,80	0,32	3,92	7,08	12,66	57,51	0,75	5,31	0,46	201,95	28,83	1,45	13,66	120,17	322,12
6	0,91	0,42	0,20	2,36	2,86	4,80	23,20	0,32	2,65	0,24	97,56	14,30	0,79	6,79	52,85	150,41
7	2,00	1,06	0,40	5,99	3,24	4,88	26,81	0,55	3,60	0,32	129,32	19,25	1,13	12,60	68,83	198,15
8	2,08	1,03	0,42	4,29	2,89	3,90	22,97	0,45	3,06	0,37	119,41	17,70	0,98	10,65	59,71	179,13
9	1,70	0,75	0,36	3,24	0,60	1,90	11,86	0,24	1,69	0,00	91,19	9,73	0,50	6,29	32,21	123,39
10	1,37	0,57	0,21	2,64	0,24	1,13	5,97	0,10	0,82	0,30	89,90	4,28	0,22	5,11	17,63	107,53

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

Tabela 19. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  sob fluxo de oxigênio.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	Mistura de epóxidos	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ compostos de oxidação	$\Sigma$ compostos de degradação	Carotenóides totais
0	< lq	< lq	0,41	0,65	0,32	5,04	< lq	< lq	< lq	566,32	1,18	< lq	1,06	7,60	573,92
1	0,34	0,26	0,91	1,00	7,50	40,40	0,55	3,86	0,12	429,21	25,63	0,62	2,63	81,20	510,41
1,5	0,26	0,20	1,27	0,92	6,73	35,37	0,37	3,34	0,20	392,99	19,90	0,38	2,85	68,93	461,92
2	1,00	0,66	5,00	0,80	8,97	45,24	0,60	3,70	0,47	258,23	24,64	0,74	7,93	91,83	350,05
2,5	1,11	0,65	2,83	0,79	10,19	48,25	0,80	4,73	0,45	150,90	30,74	0,77	5,83	101,31	252,22
3	1,88	0,94	5,65	0,64	6,99	34,88	0,43	3,53	0,63	132,75	21,17	0,61	9,74	77,35	210,11
3,5	1,81	0,89	3,75	0,35	3,19	15,64	0,27	1,79	0,52	45,03	10,58	0,34	7,33	39,13	84,15
4	3,05	1,18	3,01	0,35	1,30	6,63	< lq	0,90	0,16	25,98	5,46	0,24	7,76	22,28	48,27

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

Tabela 20. Concentração de carotenóides ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  sob fluxo de nitrogênio.

Tempo (min)	$\beta$ -apo-12'-carotenal	$\beta$ -apo-10'-carotenal	5,6-epóxi- $\beta$ -caroteno	Mistura de epóxidos	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13'-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> -5,8-epóxi- $\beta$ -caroteno	13,15-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	9,13-di- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	$\Sigma$ compostos de oxidação	$\Sigma$ compostos de degradação	Carotenóides totais
0	< lq	< lq	0,63	1,76	0,61	7,43	< lq	0,53	< lq	< lq	556,52	1,37	< lq	2,39	12,32	568,85
5	0,50	0,36	2,54	8,53	14,98	68,47	1,16	7,05	< lq	< lq	211,08	41,21	1,61	11,94	146,42	357,49
10	0,33	0,29	2,48	7,69	12,10	59,57	1,75	7,83	< lq	< lq	185,82	46,67	2,06	10,78	140,76	326,58
15	< lq	< lq	0,32	8,76	13,16	74,18	3,56	11,61	0,65	0,68	200,61	78,12	3,62	9,73	194,65	395,26
20	0,39	0,26	0,32	8,06	12,03	71,33	2,72	11,08	0,61	0,49	241,42	73,17	3,49	9,64	183,96	425,38
25	0,19	0,11	0,23	9,44	14,01	79,94	4,23	13,17	0,87	0,87	203,32	89,78	4,14	10,83	216,97	420,29
30	0,08	0,08	< lq	8,75	12,19	77,13	4,54	14,38	1,05	0,68	189,67	92,75	4,40	9,95	216,02	405,69
60	< lq	< lq	0,18	8,46	11,55	74,37	4,63	14,12	1,40	0,76	183,32	94,15	4,51	10,05	214,12	397,45
120	< lq	< lq	0,16	7,21	9,94	64,79	4,08	12,28	1,53	0,97	154,78	82,07	4,17	8,90	187,20	341,97
180	< lq	< lq	0,14	7,74	10,37	65,56	4,18	12,44	1,28	0,92	162,95	83,80	3,60	9,15	190,01	352,97

< lq: menor que o limite de quantificação de  $4,57 \times 10^{-7} \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ .

## 8.2 Apêndice 2

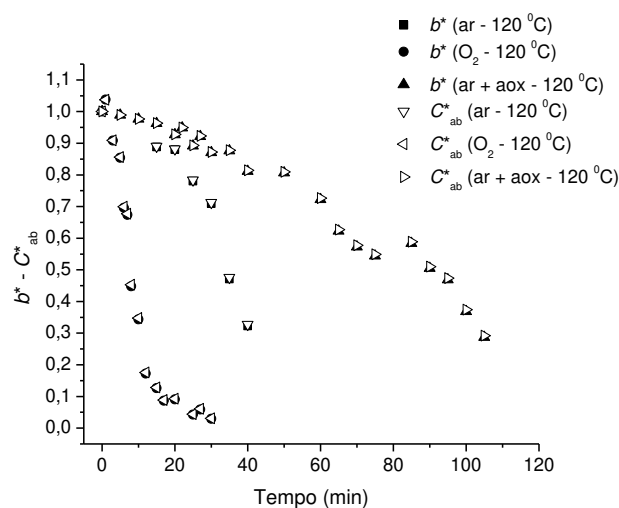


Figura 43. Comportamento da coordenada de cor  $b^*$  e do croma ( $C^*_{ab}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a 120 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila.

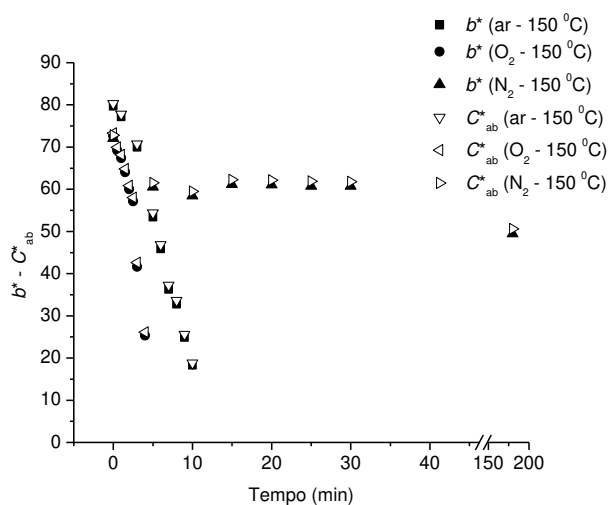


Figura 44. Comportamento da coordenada de cor  $b^*$  e do croma ( $C^*_{ab}$ ) durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio.

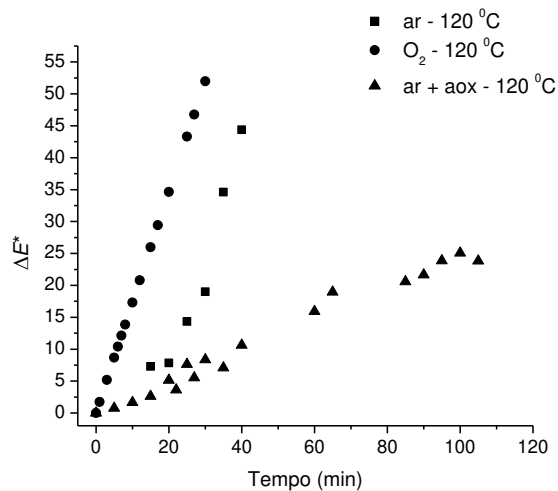


Figura 45. Diferença global da cor durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a 120 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e presença de ar com galato de propila.

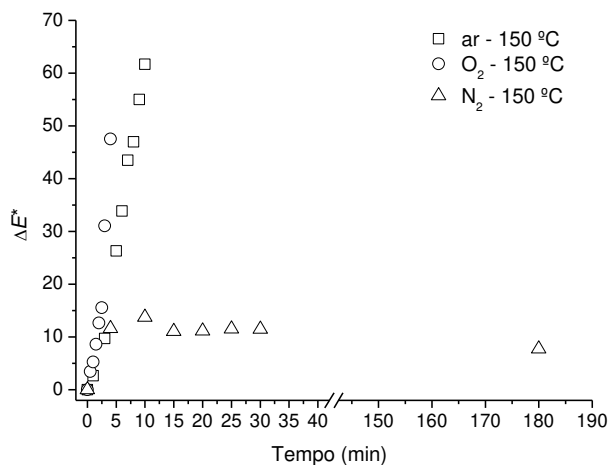


Figura 46. Diferença global da cor durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno a 150 °C em presença de ar, fluxo de oxigênio e de nitrogênio.



Tabela 21. Análise de regressão, com nível de significância de 95 %, entre a concentração de all-*trans*- $\beta$ -caroteno, carotenóides totais medidos por HPLC-DAD e carotenóides totais medidos em espectrofotômetro-DAD com os parâmetros de cor durante aquecimento de  $\beta$ -caroteno sob diferentes condições.

Parâmetro	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno HPLC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Carotenóides totais – HPLC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Carotenóides totais - espectrofotômetro ( $\mu\text{g/mL}$ )
Temperatura 120 °C em presença de ar			
$L^*$	$R^2 = 0,9693$	$R^2 = 0,9734$	$R^2 = 0,9944$
Equação	$y = -0,4943x + 98,817$	$Y = -0,4978x + 98,884$	$y = -0,7519x + 99,491$
$a^*$	$R^2 = 0,9168$	$R^2 = 0,9256$	$R^2 = 0,9687$
Equação	$y = -0,9978x - 4,7206$	$Y = -1,0075x - 4,5759$	$y = -1,5403x - 3,2898$
$b^*$	$R^2 = 0,9787$	$R^2 = 0,9827$	$R^2 = 0,9950$
equação	$y = 9,0909x + 16,434$	$Y = 9,1548x + 15,202$	$y = 13,77x + 4,2148$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,9781$	$R^2 = 0,9822$	$R^2 = 0,9956$
Equação	$y = 9,1242x + 17,022$	$Y = 9,1887x + 15,784$	$y = 13,824x + 4,7451$
$h_{ab}$	$r^2 = 0,9715$	$R^2 = 0,9705$	$R^2 = 0,9926$
Equação	$y = -0,9108x - 76,733$	$Y = -0,9178x - 76,608$	$y = -1,387x - 75,486$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,9783$	$R^2 = 0,9823$	$R^2 = 0,9715$
Equação	$y = -9,1578x + 48,932$	$y = -9,2224x + 50,174$	$y = -13,362x + 59,317$
Temperatura 120 °C com fluxo de oxigênio			
$L^*$	$R^2 = 0,9293$	$R^2 = 0,9321$	$R^2 = 0,9915$
Equação	$y = -0,9163x + 99,833$	$y = -0,9157x + 99,895$	$y = -0,4508x + 99,019$
$a^*$	$R^2 = 0,9016$	$R^2 = 0,9126$	$R^2 = 0,9674$
Equação	$y = -2,2301x + 0,9253$	$y = -2,2265x + 1,0696$	$y = -1,1004x - 1,0441$
$b^*$	$R^2 = 0,9263$	$R^2 = 0,9298$	$R^2 = 0,9939$
Equação	$y = 16,136x - 13,686$	$y = 16,132x - 14,791$	$y = 7,9624x + 0,5639$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,9264$	$R^2 = 0,9299$	$R^2 = 0,9940$
Equação	$y = 16,282x - 13,628$	$y = 16,277x - 14,741$	$y = 8,0337x + 0,7515$
$h_{ab}$	$R^2 = 0,8899$	$R^2 = 0,8938$	$R^2 = 0,9247$
Equação	$y = -1,839x - 72,85$	$y = -1,8391x - 72,722$	$y = -0,893x - 74,528$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,8246$	$R^2 = 0,8185$	$R^2 = 0,8185$
Equação	$y = -9,388x + 47,26$	$y = -9,3571x + 47,823$	$y = -4,4555x + 38,301$
Temperatura 120 °C em presença de ar com galato de propila			
$L^*$	$R^2 = 0,9538$	$R^2 = 0,9585$	$R^2 = 0,9880$
Equação	$y = -0,6646x + 94,918$	$y = -0,6451x + 94,934$	$y = -0,9299x + 95,513$
$a^*$	$R^2 = 0,8324$	$R^2 = 0,8276$	$R^2 = 0,9339$
Equação	$y = -0,8808x - 5,0782$	$y = -0,8548x - 5,0578$	$y = -1,261x - 4,2206$
$b^*$	$R^2 = 0,9375$	$R^2 = 0,9319$	$R^2 = 0,9944$
Equação	$y = 9,707x + 15,478$	$y = 9,4197x + 15,257$	$y = 13,861x + 6,1588$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,9368$	$R^2 = 0,9312$	$R^2 = 0,9943$
Equação	$y = 9,7186x + 16,121$	$y = 9,431x + 15,899$	$y = 13,878x + 6,7902$

Continuação da Tabela 21

$h_{ab}$	$R^2 = 0,9320$	$R^2 = 0,9265$	$R^2 = 0,9942$
Equação	$y = -0,9657x - 76,759$	$y = -0,9371x - 76,738$	$y = -1,3774x - 75,834$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,9157$	$R^2 = 0,9112$	$R^2 = 0,9293$
Equação	$y = -5,5075x + 33,219$	$y = -5,3471x + 33,354$	$y = -7,8042x + 38,327$
Temperatura 150 °C em presença de ar			
$L^*$	$R^2 = 0,8368$	$R^2 = 0,9002$	$R^2 = 0,9024$
Equação	$y = -0,5932x + 97,097$	$y = -0,6404x + 97,558$	$y = -0,9636x + 98,337$
$a^*$	$R^2 = 0,3717$	$R^2 = 0,4916$	$R^2 = 0,7589$
Equação	$y = -0,5501x - 7,1085$	$y = -0,6585x - 6,472$	$y = -1,2296x - 4,9652$
$b^*$	$R^2 = 0,8469$	$R^2 = 0,9144$	$R^2 = 0,9970$
Equação	$y = 8,884x + 24,589$	$y = 9,6091x + 17,626$	$y = 3,0157x + 4,1019$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,8420$	$R^2 = 0,9109$	$R^2 = 0,9971$
Equação	$y = 8,8512x + 25,48$	$y = 9,5831x + 18,511$	$y = 15,068x + 4,9356$
$h_{ab}$	$R^2 = 0,9212$	$R^2 = 0,9572$	$R^2 = 0,9666$
Equação	$y = -1,1019x - 75,902$	$y = -1,1692x - 75,111$	$y = -1,7657x - 73,67$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,8450$	$R^2 = 0,9131$	$R^2 = 0,9969$
Equação	$y = -8,9024x + 55,221$	$y = -9,6329x + 62,211$	$y = -15,126x + 75,799$
Temperatura 150 °C com fluxo de oxigênio			
$L^*$	$R^2 = 0,7731$	$R^2 = 0,8759$	$R^2 = 0,9697$
Equação	$y = -0,4361x + 95,722$	$y = -0,4651x + 96,08$	$y = -0,6313x + 96,833$
$a^*$	$R^2 = 0,3039$	$R^2 = 0,4264$	$R^2 = 0,7664$
Equação	$y = -0,3766x - 8,5579$	$y = -0,447x - 8,1082$	$y = -0,7731x - 6,8035$
$b^*$	$R^2 = 0,7170$	$R^2 = 0,8322$	$R^2 = 0,9720$
Equação	$y = 6,9305x + 39,83$	$y = 7,4821x + 33,871$	$y = 10,432x + 20,784$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,7131$	$R^2 = 0,8287$	$R^2 = 0,9718$
Equação	$y = 6,8922x + 40,734$	$y = 7,4458x + 34,792$	$y = 10,402x + 21,696$
$h_{ab}$	$R^2 = 0,7470$	$R^2 = 0,8590$	$R^2 = 0,9714$
Equação	$y = -0,9486x - 77,675$	$y = -1,0194x - 76,874$	$y = -1,3984x - 75,17$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,7162$	$R^2 = 0,8313$	$R^2 = 0,9721$
Equação	$y = -6,9549x + 32,919$	$y = -7,5091x + 38,901$	$y = -10,475x + 52,054$
Temperatura 150 °C com fluxo de nitrogênio			
$L^*$	$R^2 = 0,0130$	$R^2 = 0,0042$	$R^2 = 0,0626$
Equação	$y = -0,1026x + 96,453$	$y = -0,0967x + 96,596$	$y = 0,718x + 93,452$
$a^*$	$R^2 = 0,5313$	$R^2 = 0,2703$	$R^2 = 0,1869$
Equação	$y = 0,3382x - 12,01$	$y = 0,4023x - 12,805$	$y = 0,6406x - 13,702$
$b^*$	$R^2 = 0,7216$	$R^2 = 0,6842$	$R^2 = 0,9657$
Equação	$y = 4,0765x + 50,44$	$y = 6,619x + 33,937$	$y = 15,058x + 1,7728$
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,7113$	$R^2 = 0,6795$	$R^2 = 0,9633$
Equação	$y = 3,9638x + 51,757$	$y = 6,4603x + 35,615$	$y = 14,728x + 4,1004$
$h_{ab}$	$R^2 = 0,8623$	$R^2 = 0,6942$	$R^2 = 0,9189$
Equação	$y = -0,9001x - 77,207$	$y = -1,3467x - 74,011$	$y = -2,9668x - 67,84$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,4481$	$R^2 = 0,3216$	$R^2 = 0,1842$
Equação	$y = -2,5978x + 15,717$	$y = -3,6698x + 24,092$	$y = -5,3179x + 30,248$

### 8.3 Apêndice 3

Tabela 22. Valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  e  $h_{ab}$  com diferentes diluições realizadas durante reação química de  $\beta$ -caroteno com  $KMnO_4$ ,

Tempo (min)	$L^{*1}$	$L^{*2}$	$L^{*3}$	$L^{*4}$	$a^{*1}$	$a^{*2}$	$a^{*3}$	$a^{*4}$	$b^{*1}$	$b^{*2}$	$b^{*3}$	$b^{*4}$	$C^*_{ab}{}^1$	$C^*_{ab}{}^2$	$C^*_{ab}{}^3$	$C^*_{ab}{}^4$	$h_{ab}{}^1$	$h_{ab}{}^2$	$h_{ab}{}^3$	$h_{ab}{}^4$
0	90,2	93,7	94,3	91,6	-4,3	-6,9	-7,7	-7,1	118,0	109,0	99,7	82,7	118,0	110,0	100,0	83,0	92,1	93,6	94,4	94,9
60	90,6	93,9	94,0	96,3	-0,8	-3,2	-2,4	-3,6	83,9	71,2	61,8	43,7	83,9	71,3	61,9	43,9	90,6	92,6	92,2	94,8
120	90,6	94,1	95,1	96,0	-0,7	-3,0	-3,4	-3,7	81,7	68,9	59,4	42,8	81,7	68,9	59,5	43,0	90,5	92,5	93,2	94,7
180	90,6	94,0	94,9	96,3	-0,6	-2,9	-3,3	-3,6	82,8	70,1	60,5	44,0	82,8	70,1	60,6	44,1	90,4	92,3	93,1	95,0
240	89,7	94,3	95,3	96,3	-0,8	-3,1	-3,4	-3,5	79,1	67,6	57,5	41,6	79,1	67,6	57,6	41,7	90,6	92,6	93,4	94,8
360	89,9	94,3	95,1	96,0	-0,6	-2,9	-3,3	-4,7	79,6	68,0	57,4	41,4	79,6	68,1	57,5	41,6	90,4	92,4	93,3	95,7
480	89,3	93,9	94,9	96,4	-0,4	-3,2	-4,0	-3,6	89,0	76,8	64,4	46,4	89,0	76,9	64,5	46,6	90,2	92,4	93,5	95,2
600	89,7	94,5	95,5	96,8	-0,2	-2,7	-3,5	-3,9	82,7	70,0	55,0	39,4	82,7	70,1	55,1	39,6	90,2	92,2	93,6	95,2

<sup>1</sup>: Fator de diluição 93.

<sup>2</sup>: Fator de diluição 63.

<sup>3</sup>: Fator de diluição 43.

<sup>4</sup>: Fator de diluição 39.

## 8.4 Apêndice 4

Tabela 23. Valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  e  $h_{ab}$  com diferentes diluições realizadas durante reação química de  $\beta$ -caroteno com MCPBA.

Tempo (min)	$L^{*1}$	$L^{*2}$	$L^{*3}$	$L^{*4}$	$a^{*1}$	$a^{*2}$	$a^{*3}$	$a^{*4}$	$b^{*1}$	$b^{*2}$	$b^{*3}$	$b^{*4}$	$C^*_{ab}{}^1$	$C^*_{ab}{}^2$	$C^*_{ab}{}^3$	$C^*_{ab}{}^4$	$h_{ab}{}^1$	$h_{ab}{}^2$	$h_{ab}{}^3$	$h_{ab}{}^4$
0	98,5	98,5	96,2	95,3	-6,0	-9,0	-10,1	-10,4	26,1	47,4	64,9	78,8	26,8	48,2	65,7	79,4	103,0	100,8	98,8	97,5
3	97,9	97,8	96,5	93,4	-7,4	-10,6	-11,4	-10,3	31,5	56,8	75,7	88,8	32,4	57,8	76,5	89,4	103,2	100,5	98,6	96,6
5	98,3	98,2	96,8	93,7	-7,0	-10,5	-11,9	-11,2	27,3	49,7	66,9	79,2	28,2	50,8	67,9	80,0	104,3	101,9	100,1	98,0
7	98,3	98,5	97,7	94,2	-6,4	-10,0	-11,7	-11,4	23,5	43,3	58,7	70,2	24,4	44,4	59,8	71,1	105,1	103,0	101,2	99,2
10	99,2	99,2	97,1	96,4	-6,6	-10,3	-11,8	-12,7	22,9	40,9	56,3	68,6	23,8	42,2	57,5	69,8	106,2	104,2	101,9	100,5
15	99,6	100,1	98,3	96,9	-5,8	-8,9	-11,5	-12,6	18,5	28,1	46,1	57,2	19,4	29,4	47,5	58,6	107,5	107,5	104,0	102,4
20	99,1	99,4	99,0	95,8	-4,3	-7,6	-9,8	-10,5	12,7	23,9	33,6	41,5	13,4	25,1	35,0	42,9	108,7	107,5	106,2	104,2
40	99,0	99,8	98,8	96,0	-4,5	-7,9	-10,2	-11,1	12,5	23,8	33,0	41,1	13,3	25,0	34,5	42,6	109,7	108,5	107,2	105,1
50	99,0	99,9	98,9	96,0	-3,9	-7,1	-9,1	-10,1	10,8	20,6	28,6	35,7	11,5	21,8	30,1	37,1	110,0	108,9	107,7	105,8
60	99,2	99,9	99,1	96,1	-3,7	-6,8	-8,9	-9,9	10,1	19,4	27,1	34,0	10,7	20,5	28,5	35,4	110,2	109,4	108,2	106,2
80	99,0	99,9	99,0	95,9	-4,5	-7,9	-10,1	-11,0	12,3	23,4	32,2	39,9	13,1	24,7	33,7	41,4	110,0	108,7	107,4	105,5
100	99,1	100,0	99,1	96,2	-4,3	-7,5	-9,6	-10,5	11,7	21,9	30,1	37,5	12,4	23,2	31,6	38,9	110,1	108,9	107,7	105,7
120	99,1	100,0	99,1	96,6	-4,3	-7,6	-9,7	-10,7	11,7	21,9	30,0	37,9	12,4	23,2	31,6	39,4	110,4	109,2	107,9	105,7
180	98,9	99,8	99,0	96,1	-4,6	-7,9	-10,0	-10,9	12,6	23,5	32,3	40,0	13,4	24,8	33,8	41,5	109,9	108,6	107,2	105,2
240	99,3	99,9	99,3	96,0	-4,3	-7,5	-9,6	-10,4	12,0	22,2	30,7	37,9	12,8	23,4	32,2	39,3	109,8	108,8	107,4	105,4
360	99,6	99,9	99,0	95,9	-4,4	-7,7	-9,9	-10,7	12,2	22,6	31,2	38,4	13,0	23,9	32,7	39,8	109,8	108,9	107,6	105,6
480	99,5	99,9	99,0	95,7	-4,5	-7,9	-10,1	-10,9	12,5	23,2	32,3	40,2	13,3	24,5	33,8	41,7	109,8	108,9	107,4	105,2

<sup>1</sup>: Fator de diluição 93.<sup>2</sup>: Fator de diluição 48.<sup>3</sup>: Fator de diluição 33.<sup>4</sup>: Fator de diluição 25,5.

Tabela 24. Análise de regressão, com nível de significância de 95 %, entre as absorvâncias a 330, 400, 425 e 450 nm e parâmetros de cor durante reação química de  $\beta$ -caroteno com  $\text{KMnO}_4$  e MCPBA.

Parâmetro	450 nm	425 nm	400 nm	330 nm
Reação química de $\beta$ -caroteno com $\text{KMnO}_4$				
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,9912$	$R^2 = 0,9907$	$R^2 = 0,9678$	$R^2 = 0,7529$
Equação	$y = 68,20x + 15,72$	$y = 74,10x + 8,06$	$y = 87,07x - 7,39$	$y = 91,46x - 23,11$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,9908$	$R^2 = 0,9904$	$R^2 = 0,968$	$R^2 = 0,7538$
Equação	$y = -68,32x + 67,44$	$y = -74,23x + 75,12$	$y = -87,25x + 90,62$	$y = -91,70x + 106,42$
Reação química de $\beta$ -caroteno com MCPBA				
$C^*_{ab}$	$R^2 = 0,9967$	$R^2 = 0,8914$	$R^2 = 0,0868$	$R^2 = 0,5471$
Equação	$y = 23,10x + 3,88$	$y = 34,00x - 12,57$	$y = 13,44x - 0,66$	$y = -16,46x + 45,56$
$\Delta E^*$	$R^2 = 0,9838$	$R^2 = 0,8846$	$R^2 = 0,0614$	$R^2 = 0,5928$
Equação	$y = -21,67x + 22,51$	$y = -31,99x + 38,03$	$y = -10,67x + 24,32$	$y = 16,19x - 17,90$