

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

# FLORES E MICROALGAS COMO FONTES ALTERNATIVAS DE CAROTENÓIDES

## PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Marise Costa de Mello** aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de novembro de 2002.

Campinas, 26 de novembro de 2002.

  
Profa. Dra. Délia Rodriguez Amaya  
Presidente da Banca

MARISE COSTA DE MELLO  
Engenheira Química  
Mestre em Tecnologia de Alimentos

  
Profa. Dra. DELIA RODRIGUEZ-AMAYA  
Orientadora

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

CAMPINAS - SP  
2002

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | BC                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | M489f                               |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC/  | 52193                               |
| PROC.      | 124103                              |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$11,00                            |
| DATA       |                                     |
| Nº CPD     |                                     |

CM00177660-4

BIBID 283837

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

M489f Mello, Marise Costa de  
Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenóides  
/ Marise Costa de Mello. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Delia Rodriguez-Amaya  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Carotenóides. 2.Flores. 3.Microalgas. 4.Cromatografia.  
5.Espectrometria. I.Rodrigues-Amaya, Delia. II.Universidade  
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

## BANCA EXAMINADORA

*Delia R. Amaya*

---

DELIA RODRIGUEZ-AMAYA (ORIENTADORA)

*Adriana Z. Mercadante*

---

ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE

*Helena Teixeira Godoy*

---

HELENA TEIXEIRA GODOY

---

VALÉRIA LANEUVILLE TEIXEIRA

*Mieko Kimura*

---

MIEKO KIMURA

---

CÉLIA MARIA DE SYLOS

*Marisa Padula*

---

MARISA PADULA

CAMPINAS, \_\_\_\_ DE NOVEMBRO DE 2002

200304744

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as possibilidades deste dom.

Ao meu companheiro Yossi Zana por estar ao meu lado em todos os momentos de alegria, tristeza, decisão e luta! O meu agradecimento transcende as palavras e alcança todo o infinito.

À minha amada família e amados amigos por todo carinho e apoio ao longo de toda minha vida. Em especial à minha mãe por sua força, alegria e singeleza diante da vida. Te amo Mãe! E às amigas Antonieta Middea e Liliana Solórzano por toda a estória que construímos durante mais de 20 anos de amizade.

À Profa. Dra. Delia Rodriguez-Amaya pelos anos de orientação e sugestões na redação da tese.

Aos membros das bancas Adriana Zerlotti Mercadante, Helena Teixeira Godoy, Valéria Laneuville Teixeira, Mieko Kimura, Célia Maria de Sylos e Marisa Padula pelas correções e sugestões na redação da tese.

Aos meus amigos e pesquisadores brilhantes, Sergio de Oliveira Lourenço e Elizabete Barbarino por todo trabalho e dedicação na parte de cultivo das microalgas. Muito Obrigada!

Ao Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas pela identificação das flores estudadas.

Ao aluno Marcos Coelho Müller pela ajuda e companheirismo durante algumas das análises.

Aos Professores Paulo Moreno, Massayoshi e Massuo, aos alunos de Pós-graduação, Isabel, Mara, Ana Paula, Renata, Melina, Roberto, Paulo Benevicci, João e Leandro, ao técnico Sr. Zé e a todos que por esquecimento dos nomes não foram citados, mas que estão presentes em minha lembrança, agradeço por todo apoio e carinho com que me receberam na fase final dos experimentos no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da USP. Ao Leandro agradeço mais uma vez pelas análises de espectrometria de massas.

Ao MCT-FINEP-CNPq (PRONEX - 4196091500) e ao CNPq (Projeto nº 662307/1996-8) pelo suporte financeiro.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa para o programa de doutorado.

Às amigas Márcia, Sandra, Rose, Janice, Ornella e Iriane, meus agradecimentos pelos anos de UNICAMP que dividimos e o desejo que estejam sempre bem.

À Dona Justina, ao Sr. Lázaro e a toda nossa família de Barão Geraldo pelos momentos compartilhados.

E finalmente, a todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma me incentivaram e me ajudaram a realizar e finalizar este trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!



# ÍNDICE

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Introdução Geral..... | xiii |
| Resumo Geral.....     | xv   |
| General Abstract..... | xix  |

## CAPÍTULO 1- Carotenóides em Flores: Uma Revisão

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abstract.....                                                                                                            | 2  |
| Resumo.....                                                                                                              | 2  |
| 1-Introdução.....                                                                                                        | 3  |
| 2-Estudos de Carotenóides em Flores.....                                                                                 | 5  |
| 2.1. <i>Tagetes erecta</i> .....                                                                                         | 5  |
| 2.2. <i>Adonis aestivalis</i> .....                                                                                      | 11 |
| 2.3. <i>Brassica napus</i> .....                                                                                         | 11 |
| 2.4. <i>Calendula officinales</i> .....                                                                                  | 12 |
| 2.5. <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> .....                                                                         | 12 |
| 2.6. <i>Delonix regia</i> .....                                                                                          | 12 |
| 2.7. <i>Dendrobium</i> (Orchidaceae).....                                                                                | 14 |
| 2.8. <i>Eschscholtzia californica</i> .....                                                                              | 14 |
| 2.9. <i>Helianthus annuus</i> , <i>Impatiens noli tangere</i> , <i>Ranunculus acer</i> , <i>Taraxacum officinale</i> ... | 14 |
| 2.10. <i>Hemerocallis disticha</i> .....                                                                                 | 15 |
| 2.11. <i>Lathyrus aphaca</i> .....                                                                                       | 15 |
| 2.12. <i>Lilium pumilum</i> .....                                                                                        | 15 |
| 2.13. <i>Lilium trigrinum</i> cv. ....                                                                                   | 15 |
| 2.14. <i>Narcissus</i> cvv "Golden Harvest" .....                                                                        | 16 |
| 2.15. <i>Narcissus poeticus</i> L., <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. e <i>Tulipa</i> sp. L. ....                      | 16 |
| 2.16. <i>Parkinsonia aculeata</i> L. e <i>Pongamia pinnata</i> Vent. ....                                                | 17 |
| 2.17. <i>Pastinaca saliva</i> .....                                                                                      | 17 |
| 2.18. Cultivares de <i>Pelargonium</i> .....                                                                             | 17 |
| 2.19. <i>Petunias hybrida</i> Vilm. ....                                                                                 | 18 |
| 2.20. <i>Primula veris</i> L. ....                                                                                       | 18 |
| 2.21. <i>Primula vulgaris</i> .....                                                                                      | 18 |
| 2.22. <i>Pyrostegia venusta</i> .....                                                                                    | 19 |
| 2.23. <i>Rosa foetida</i> e outras variedades.....                                                                       | 19 |
| 2.24. <i>Sandersonia aurantiaca</i> .....                                                                                | 19 |
| 2.25. <i>Tecoma stans</i> .....                                                                                          | 22 |
| 2.26. <i>Thunbergia alata</i> .....                                                                                      | 22 |
| 2.27. <i>Trollius europaeus</i> .....                                                                                    | 22 |
| 3. Considerações Finais.....                                                                                             | 23 |
| 4. Referências Bibliográficas.....                                                                                       | 24 |

## CAPÍTULO 2- Produção e Aplicação de Carotenóides de Microalgas

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abstract.....                                                                        | 30 |
| Resumo.....                                                                          | 30 |
| 1. Introdução.....                                                                   | 31 |
| 2. Produção de $\beta$ -caroteno Através da Microalga <i>Dunaliella salina</i> ..... | 32 |
| 3. Produção de Astaxantina Através da Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> ....  | 34 |
| 4. Carotenóides Secundários de Outras Espécies de Algas verdes.....                  | 35 |
| 5.Considerações Finais.....                                                          | 37 |
| 6. Referências Bibliográficas.....                                                   | 38 |

## CAPÍTULO 3- Caracterização das Flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonia trilobata* como Fonte de Luteína

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Abstract.....                   | 45 |
| Resumo.....                     | 46 |
| Introdução.....                 | 47 |
| Material e Métodos.....         | 48 |
| Resultados e Discussão.....     | 50 |
| Referências Bibliográficas..... | 56 |

## CAPÍTULO 4- Composição de Carotenóides em Flores de *Pyrostegia venusta*

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Abstract.....                   | 59 |
| Resumo.....                     | 60 |
| Introdução.....                 | 61 |
| Material e Métodos.....         | 62 |
| Resultados e Discussão.....     | 64 |
| -Composição Qualitativa.....    | 64 |
| -Composição Quantitativa.....   | 74 |
| Conclusão.....                  | 75 |
| Referências Bibliográficas..... | 75 |

## CAPÍTULO 5- Composição de Carotenóides da Microalga *Tetraselmis gracilis*

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| Abstract.....                 | 78 |
| Resumo.....                   | 79 |
| Introdução.....               | 79 |
| Material e Métodos.....       | 80 |
| Resultados.....               | 82 |
| -Composição qualitativa.....  | 82 |
| -Composição quantitativa..... | 89 |
| Discussão.....                | 91 |
| Referências.....              | 92 |

## **CAPÍTULO 6-** Determinação da Composição de Carotenóides nas Microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Hillea* sp

|                                                      |     |
|------------------------------------------------------|-----|
| Abstract.....                                        | 95  |
| Resumo.....                                          | 96  |
| Introdução.....                                      | 97  |
| Experimental.....                                    | 98  |
| Resultados e Discussão.....                          | 100 |
| -Carotenóides da Microalga <i>Hillea</i> sp. ....    | 100 |
| -Carotenóides da Microalga <i>S. subsalsus</i> ..... | 106 |
| -Composição quantitativa.....                        | 110 |
| Referências Bibliográficas.....                      | 112 |

## INTRODUÇÃO GERAL

A importância e as aplicações dos pigmentos naturais conhecidos como carotenóides abrangem vários setores da ciência e tecnologia. O seu uso como corante natural em alimentos já é conhecido há séculos através de seus extratos naturais de urucum, açafrão e páprica. Além disto, os carotenóides conferem cor a muitos alimentos que são consumidos no dia a dia como as frutas, legumes, verduras, gema de ovos, peixes e pele de aves. Assim, estão amplamente difundidos na Natureza podendo ser encontrados tanto em vegetais, que os biossintetizam, quanto em animais, que apenas acumulam e às vezes modificam os carotenóides assimilados de suas dietas.

O grande papel dos carotenóides na saúde humana foi demonstrado em numerosos estudos epidemiológicos, que indicaram que o consumo de frutas e verduras rica em carotenóides pode diminuir o risco de alguns tipos de câncer, principalmente câncer do pulmão, da cavidade oral, do estômago e do esôfago. Foram demonstrados também outros benefícios, como redução do risco de doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata. Todavia, em vários estudos de intervenção, nos quais um grande número de pessoas ingeriram suplementos de  $\beta$ -caroteno, estes efeitos não foram observados. Na maior e mais recente investigação, 20536 indivíduos de alto risco receberam um suplemento de vitaminas antioxidantes, incluindo  $\beta$ -caroteno (20 mg diários), ou placebo por cinco anos (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002, *The Lancet*, 360: 23-33). Durante este período não foi encontrada uma redução significativa na incidência ou na mortalidade de nenhum tipo de doença vascular, câncer ou outras doenças investigadas. Assim, a eficácia de suplementos contendo  $\beta$ -caroteno é questionável, mas o consumo de alimentos ricos em carotenóides é geralmente recomendado.

A busca de fontes naturais para produção de carotenóides cresce dada a importância destes pigmentos em diferentes áreas. As flores e as microalgas são exemplos de fontes que podem ser empregadas para a obtenção de carotenóides. Embora haja uma grande variedade de flores e microalgas, a produção comercial de carotenóides a partir destas fontes é restrita. Entre as flores, apenas as de *Tagetes erecta* são cultivadas comercialmente como fonte de luteína. A única microalga empregada como fonte comercial de carotenóides, até pouco tempo atrás, era *Dunaliella salina*, considerada a principal fonte natural de  $\beta$ -caroteno. Recentemente, foi iniciada também a produção comercial de astaxantina, um cetocarotenóide de grande valor comercial, através da microalga *Haematococcus pluvialis*.

A grande variedade e quantidade de flores e microalgas na Natureza e a capacidade de ambas de biossintetizar vários tipos de carotenóides tornam a investigação da composição de carotenóides de espécies encontradas no Brasil interessante, uma vez que novas fontes destes pigmentos podem ser encontradas.

## RESUMO GERAL

Os carotenóides são pigmentos naturais que apresentam funções biológicas importantes, como atividade pró-vitáminica A e/ou antioxidativa, as quais proporcionam a diversificação de suas aplicações em áreas como alimentos, medicina, cosmética e aquacultura. Os carotenóides estão difundidos amplamente na Natureza podendo ser encontrados em flores, sementes, raízes, bactérias, fungos, algas e animais. Até o momento, mais de 600 carotenóides já foram identificados, mas apenas cinco ou seis são produzidos comercialmente em forma sintética e a preços muito elevados. Assim, cresce a busca por fontes naturais que possam ser utilizadas comercialmente para a produção de carotenóides.

No presente trabalho foram investigadas, entre as fontes naturais disponíveis, as flores de *Cosmos sulphureus*, *Thelechitonía trilobata* e *Pyrostegia venusta* e três espécies de microalgas marinhas, *Tetraselmis gracilis*, *Hillea* sp e *Synechococcus subsalsus*.

O perfil de carotenóides obtido para as flores amarelas e laranjas de *C. sulphureus* foi o mesmo, diferindo pouco do encontrado para *T. trilobata*, sendo a luteína, na forma de diésteres, o carotenóide predominante de todas. O teor médio de luteína nas flores amarelas e laranjas de *C. sulphureus* foi semelhante, em torno de 670 µg/g de material fresco, mas significativamente menor que o valor encontrado para *T. trilobata* (820 µg/g). Estes valores são comparáveis ou maiores do que aqueles citados para flores de *Tagetes erecta*, a principal fonte natural de luteína, o que indica o potencial das flores analisadas como fonte deste carotenóide.

Nas flores de *P. venusta* foram detectados 33 carotenóides e o conteúdo total de carotenóides foi estimado em 1300 µg/g de material fresco. A rubixantina (31% do total de carotenóides), principalmente na forma esterificada, e o licopeno (13% do total) foram os mais abundantes e estavam presentes nas formas geométricas *trans*-, *cis*- e *poli-cis*. O conteúdo elevado de carotenóides totais e a presença de vários carotenóides com características nutricionais e/ou antioxidativas ( $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, licopeno e rubixantina) sugere o uso das flores de *P. venusta* como fonte de extrato de corante natural ou suplemento alimentar formado por uma mistura de seus pigmentos, mas não como fonte de carotenóides específicos, devido à complexidade da sua composição.

A microalga marinha *T. gracilis* apresentou oito carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ - e  $\gamma$ -caroteno (*trans*- e *cis*) e *trans*- e *cis*-licopeno) e 17 xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina, *trans*-, 9-*cis* e 13-*cis*-luteína, zeaxantina, anteraxantina, *trans*-, 9-*cis*- e 13-*cis*-violaxantina, *trans*- e *cis*-luteoxantina, *trans*-

neoxantina, *cis*-neoxantina (a), *cis*-neoxantina (b), *cis*-neoxantina (c), triidroxi- $\beta$ -caroteno e éster de triidroxi- $\beta$ -caroteno). A luteína (1210  $\mu\text{g/g}$  peso seco) e  $\beta$ -caroteno (870  $\mu\text{g/g}$ ) foram os carotenóides majoritários. Apesar do conteúdo considerável e da importância comercial destes pigmentos, a composição carotenóidica complexa de *T. gracilis* pode dificultar o emprego desta microalga como fonte específica destes carotenóides. Todavia, condições de cultivos favoráveis à produção destes carotenóides, em detrimento dos demais, podem ser ainda encontradas e a exemplo das flores de *P. venusta*, esta microalga pode também ser indicada como fonte de extrato de corante natural ou suplemento alimentar.

Na microalga *S. subsalsus*, o  $\beta$ -caroteno (850  $\mu\text{g/g}$  peso seco) e a zeaxantina (800  $\mu\text{g/g}$ ) foram os carotenóides majoritários, enquanto que na *Hillea* sp houve predominância de aloxantina (2660  $\mu\text{g/g}$ ). Em *S. subsalsus* foram identificados também equinenona,  $\beta$ -criptoxantina e 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4' e em *Hillea* sp,  $\zeta$ -caroteno,  $\epsilon$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno (*trans* e *cis*), *cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, crocoxantina, monadoxantina e um cetocarotenóide não identificado, todos presentes em baixas concentrações. A predominância de  $\beta$ -caroteno e zeaxantina em *S. subsalsus* e aloxantina em *Hillea* sp é um aspecto positivo no eventual emprego destas microalgas como fonte comercial desses carotenóides.

## GENERAL ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments, which also have important biological functions such as provitamin A and/or antioxidant activities. With such functions, these pigments have applications in different areas such as foods, medicine, cosmetics and aquaculture. They are widely distributed in nature and can be encountered in flowers, seeds, roots, bacteria, fungi, algae and animals. At the moment more than 600 natural carotenoids have been identified, but only five or six have been produced commercially in synthetic form and at high prices. Consequently, there is an increasing search for natural sources that can be utilized commercially for the production of these important compounds.

In the present work were investigated, among the available natural sources, the flowers of *Cosmos sulphureus*, *Thelechitonina trilobata* and *Pyrostegia venusta* and the marine microalgae, *Tetraselmis gracilis*, *Hillea* sp and *Synechococcus subsalsus*.

The carotenoid profile obtained by HPLC for the yellow and orange flowers of *C. sulphureus* was identical, differing slightly from that of *T. trilobata*, with the predominance of lutein diesters. The mean lutein content of the yellow and orange flowers of *C. sulphureus* was also similar, about 670 µg/g fresh weight, but significantly lower than that of *T. trilobata* (820 µg/g). The lutein levels of these flowers are comparable or higher than those found in *Tagetes erecta*, the main natural source of lutein, which indicates the possible utilization of these flowers as commercial sources of this carotenoid.

In the flowers of *P. venusta*, the total carotenoid concentration was estimated to be 1300 µg/g fresh weight. A total of 33 carotenoids was detected, the most abundant being rubixanthin (31% of the total carotenoids) and lycopene (13% of the total). Both pigments were encountered in *trans*, *cis* and poly-*cis* geometric forms, rubixanthin being free or esterified. The elevated total carotenoid content and the presence of various carotenoids with diverse characteristics, including those having nutritional and/or antioxidative properties (β-carotene, γ-carotene, β-cryptoxanthin, lycopene, rubixanthin), suggest the viability of using the flowers of *P. venusta* as source of natural colorant extract or food supplement of mixtures of these pigments, but not as source of specific carotenoids.

The marine microalga *T. gracilis* presented eight carotenes (α-, β- and γ-carotene (*trans* and *cis*) and *trans*- and *cis*-lycopene) and 17 xanthophylls (β-cryptoxanthin, *trans*-, 9-*cis*- and 13-*cis*-lutein, zeaxanthin, antheraxanthin, *trans*-, 9-*cis*-, and 13-*cis*-violaxanthin, *trans*- and *cis*-



luteoxanthin, *trans*-neoxanthin, *cis*-neoxanthin (a), *cis*-neoxanthin (b), *cis*-neoxanthin (c), trihydroxy- $\beta$ -carotene, and ester of trihydroxy- $\beta$ -carotene). Lutein (1210  $\mu\text{g/g}$  dry weight) and  $\beta$ -carotene (870  $\mu\text{g/g}$ ) were the major carotenoids. In spite of the considerable amount and the commercial importance of these pigments, the complex carotenoid composition of *T. gracilis* can render the use of this microalga as a source of these carotenoids difficult. However, cultivation conditions favorable to the productions of these pigments, in detriment to the other carotenoids, can still be found and as is the case for the *P. venusta* flowers, this microalgae can be used as a source of natural colorants or food supplements extract.

The microalga *S. subsalus* had  $\beta$ -carotene (850  $\mu\text{g/g}$  dry weight) and zeaxanthin (800  $\mu\text{g/g}$ ) as major carotenoids, while in *Hillea* sp, alloxanthin (2660  $\mu\text{g/g}$ ) was the principal carotenoid. In *S. subsalus*, echinenone,  $\beta$ -cryptoxanthin and 3-hydroxy- $\beta$ -caroten-4-one were also found at very low levels. In *Hillea* sp,  $\zeta$ - and  $\epsilon$ -carotene,  $\alpha$ -carotene (*trans* and *cis*), *cis*- $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, crocoxanthin, monadoxanthin and a unidentified ketocarotenoid were the minor carotenoids. The predominance of the major carotenoids in the extracts of these microalgae facilitates their eventual use as commercial sources.



# **CAPÍTULO 1**

## **CAROTENÓIDES EM FLORES: UMA REVISÃO**

## CAROTENOIDS FROM FLOWERS: A REVIEW

Marise C. de Mello and Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de  
Campinas - C. P.: 6121- CEP: 13083-970 - Campinas - SP-Brasil

**ABSTRACT** - Carotenoids constitute one of the most important groups of natural pigments, being widely distributed in nature and having important functions in human health. In flowers, the presence of these pigments provides brilliant yellow and red colors. Various types of carotenoids have already been identified in different flowers, the presence of esterified xanthophylls being very common. To date only the flowers of *Tagetes erecta* are employed as commercial source of the carotenoid lutein. However, other flowers (or their extracts), such as *Adonis astivalis* (rich in diesters of astaxanthin) and *Delonix regia* (rich in  $\beta$ -carotene), have already been indicated as sources of pigments for fish and poultry, respectively. Moreover, there are varieties of flowers awaiting investigation that can have commercial potential for the production of carotenoids. In the present paper a review of carotenoids in flowers and their applications is presented.

## CAROTENÓIDES EM FLORES: UMA REVISÃO

**RESUMO** - Os carotenóides formam um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais por estarem amplamente difundidos na Natureza e apresentarem funções importantes à saúde humana. Nas flores, a presença destes pigmentos proporciona colorações amarelas e vermelhas brilhantes. Vários tipos de carotenóides já foram identificados em diferentes flores, sendo muito comum à presença de xantofilas esterificadas. Até o momento, apenas as flores de *Tagetes erecta* são empregadas como fonte comercial do carotenóide luteína. Entretanto, outras flores (ou seus extratos), como as de *Adonis astivalis* (ricas em diésteres de astaxantina) e *Delonix regia* (ricas em  $\beta$ -caroteno), já foram indicadas como fonte de pigmentos para alimentar peixes e aves, respectivamente. Além disto, existem muitas variedades de flores ainda não investigadas que podem ter um potencial comercial para produção de carotenóides. No presente artigo, uma revisão sobre carotenóides de flores e suas aplicações é apresentada.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na Natureza, podendo ser encontrados em fungos, bactérias, leveduras, frutas, folhas, flores, raízes, sementes e animais (Simpson e Chichester, 1981). Embora sejam substâncias suscetíveis a degradações, suas propriedades fisiológicas e nutricionais, bem como os avanços tecnológicos contribuem para torná-los os corantes naturais mais utilizados em alimentos. Estes pigmentos são vendidos na forma de extratos naturais ou compostos sintéticos idênticos aos naturais. Os extratos naturais de carotenóides, comercializados há séculos, são urucum, açafrão e páprica. Até o momento, os carotenóides sintetizados industrialmente são o  $\beta$ -caroteno, licopeno, cantaxantina,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, ácido  $\beta$ -apo-8'-carotenóico, citranaxantina e astaxantina, sendo os três últimos usados principalmente em rações.

Geralmente os carotenóides são constituídos de oito unidades isoprênicas unidas através de ligações cabeça e cauda, exceto no centro da molécula onde a ligação é cauda-cauda. Assim, o plano de simetria da molécula é reverso no centro e os dois grupos metílicos centrais encontram-se separados por seis átomos de carbono e os demais por cinco.

Estes pigmentos estão divididos em dois grupos denominados carotenos e xantofilas. Os carotenos são formados por apenas carbono e hidrogênio, enquanto as xantofilas possuem também oxigênio sob a forma de diferentes grupos, como epóxi, hidróxi (monóis, dióis e polióis), metóxi, aldeídico, cetônico e carboxílico. Quanto às suas estruturas, os carotenóides podem ser acíclicos, mono e bicíclicos.

Até 1986 mais de 600 carotenóides já haviam sido identificados (Pfander, 1987) e, posteriormente, uma lista contendo 54 carotenóides novos foi publicada (Kull e Pfander, 1995a). Esta multiplicidade de carotenóides deve-se às diferentes modificações da sua estrutura básica através de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de ligação dupla, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinações destes processos. Estima-se que a quantidade de carotenóides produzida por ano na Natureza seja mais de 100 milhões de toneladas. A biossíntese de carotenóides ocorre somente no reino vegetal, enquanto os animais apenas acumulam carotenóides ingeridos de suas dietas, podendo ou não modificá-los.

A maioria dos carotenóides absorve luz de comprimentos de onda na faixa de 400 a 500 nm devido à presença de um cromóforo em sua molécula, ou seja, seu sistema de ligações duplas conjugadas. Dependendo do número de ligações duplas, o cromóforo absorve em regiões diferentes, o que por sua vez resulta em um pigmento de cor diferente. Por exemplo, carotenóides com menos de sete ligações duplas conjugadas, como o fitoeno e o fitoflueno, são incolores, mas o  $\zeta$ -caroteno que apresenta sete ligações duplas conjugadas possui uma coloração amarela clara. A intensidade da coloração aumenta com o aumento do número de ligações duplas conjugadas. Assim, o licopeno com 11 ligações duplas conjugadas apresenta coloração vermelha. Por outro lado, a ciclização diminui a coloração, uma vez que as ligações duplas dos anéis encontram-se fora do plano das ligações duplas da cadeia poliênica linear. Desta forma, apesar do  $\beta$ -caroteno apresentar 11 ligações duplas conjugadas, sua cor é laranja, e não vermelha como a do licopeno (Rodriguez-Amaya, 1993a).

As vantagens do uso de carotenóides para colorir alimentos são a boa estabilidade na faixa de pH da maioria destes produtos, a não corrosibilidade, a estabilidade na presença de substâncias redutoras e o fato de serem um corante natural. Embora sejam parcialmente solúveis em óleo e insolúveis em água, formulações comerciais de carotenóides na forma de emulsões ou preparações coloidais e soluções oleosas permitem que sejam usados tanto em produtos à base de água quanto à base de óleo, além de protegê-los da oxidação e isomerização. A estabilidade e a reprodutibilidade destas preparações dependem de fatores intrínsecos (como estrutura do carotenóide e natureza e composição da matriz) e extrínsecos (como disponibilidade de oxigênio, presença de luz, temperatura). O tempo e custo de produção destes extratos naturais são maiores que os requeridos para corantes sintéticos. Todavia, as vantagens citadas associadas às propriedades fisiológicas e nutricionais dos carotenóides superam estas desvantagens e vêm incrementando cada vez mais as aplicações destes pigmentos.

As diferentes funções fisiológicas dos carotenóides estão diretamente relacionadas às suas estruturas. Para apresentar atividade pró-vitáminica A, estes pigmentos devem possuir pelo menos um anel  $\beta$ -ionona não substituído e uma cadeia poliênica com no mínimo 11 carbonos. A atividade vitamínica é maior quando o sistema de ligações duplas conjugadas está em configuração todo-*E* (todo-*trans*). O  $\beta$ -caroteno é a pró-vitamina A mais importante por apresentar a maior biopotência (100% de atividade) e estar amplamente distribuído na Natureza (Rodriguez-Amaya, 1993b). Já para desempenhar sua função como antioxidante e apresentar proteção máxima, os carotenóides devem possuir no mínimo nove ligações duplas conjugadas (Foote et al., 1970). Neste caso, os carotenóides, através de seu sistema de

ligações duplas conjugadas, sequestram o oxigênio singlete e reagem com radicais livres desativando-os.

Devido às funções e ações dos carotenóides, que foram mencionadas anteriormente e bem destacadas na literatura internacional, a busca por fontes alternativas destes pigmentos vem aumentando, e entre as diferentes opções, estão as flores. No presente trabalho foram compilados estudos sobre a composição de carotenóides em flores e suas aplicações.

## 2. ESTUDOS DE CAROTENÓIDES EM FLORES

Na fase inicial de desenvolvimento, as flores apresentam cloroplastos, os quais contêm clorofilas e carotenóides. Com o amadurecimento das flores, as clorofilas vão desaparecendo enquanto a concentração de carotenóides aumenta. Durante este processo os cloroplastos são substituídos pelos cromoplastos, que possuem estruturas especializadas compostas de carotenóides, lipídios e proteínas, cuja função é acumular grandes quantidades de carotenóides. Os carotenóides nos cromoplastos de pétalas são os responsáveis pelas intensas cores amarelas, laranjas e vermelhas. Geralmente as flores maduras acumulam xantofilas aciladas como carotenóides secundários, pois parece que esta forma facilita o acúmulo e a preservação dos carotenóides (Bartley e Scolnik, 1995) por ser mais lipossolúvel e estável, o que por sua vez facilita provavelmente a incorporação destes pigmentos pela membrana (Minguez-Mosquera e Hornero-Mendez, 1994). Além disto, esterificação de carotenóides também é importante na própria formação dos cromoplastos (Emter et al., 1990).

Nas flores, as funções dos carotenóides de fotoproteção e de pigmentos acessórios, fundamentais em tecidos fotossintéticos, deixam de ser essenciais. A cor conferida às flores por estes pigmentos teria a função de ajudar a atrair insetos e animais polinizadores, auxiliando desta forma o processo de reprodução (Bartley e Scolnik, 1995).

Na Tabela 1 estão resumidos os resultados de estudos sobre o isolamento de carotenóides em algumas flores e partes florais.

### 2.1. *Tagetes erecta*

*Tagetes erecta* é uma planta nativa do México (Tosco, 1970) que apresenta flores de coloração amarela ou laranja brilhante. Até o momento, estas são as únicas flores de importância comercial como fonte de carotenóides e por esta razão tem sido investigadas por vários pesquisadores.

Tabela 1- Carotenóides de Flores

| Plantas                                        | Partes         | Carotenóides                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Referências                        |
|------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Adonis aestivalis</i>                       | flores         | 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 36,37,38,79                        |
| <i>Brassica napus</i>                          | pétalas        | 44,46,73,78,83,85,87,91,93,94,102,103                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 13,40,41                           |
| <i>Calendula officinalis</i>                   | pétalas        | 6,10,11,13,17,22,27,37,51,70,82,103,105,114,136,141,142,143,144,145,146,147                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1,19,90                            |
| <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>          | flores         | 4,11,13,38,49,50,56,57,59,104                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 31,32,66,81                        |
| <i>Delonix regia</i>                           | partes florais | 1 <sup>D,F,G</sup> , 2 <sup>D,F,G</sup> , 5 <sup>D,F,G</sup> , 6 <sup>D,F,G</sup> , 7 <sup>D,F,G</sup> , 8 <sup>D,F,G</sup> , 9 <sup>D,F,G</sup> , 10 <sup>D,F,G</sup> , 11 <sup>F</sup> , 13 <sup>C,D,F,G</sup> , 14 <sup>C,D</sup> , 22 <sup>G</sup> , 24 <sup>D,G</sup> , 26 <sup>C,D,G</sup> , 27 <sup>G</sup> , 29 <sup>G</sup> , 30 <sup>C,D,F,G</sup> , 37 <sup>D,F,G</sup> , 51 <sup>D,G</sup> , 63 <sup>C,D,F,G</sup> , 70 <sup>C,D,F,G</sup> , 74 <sup>F,G</sup> , 82 <sup>C,D,F,G</sup> , 102 <sup>D,F,G</sup> , 103 <sup>D,F,G</sup> , 105 <sup>C,D,F,G</sup> , 106 <sup>G</sup> , 13,37,82,74 | 35,73,85                           |
| <i>Dendrobium (Orchidaceae)</i>                | pétalas        | 139                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 84                                 |
| <i>Eschscholzia californica</i>                | pétalas        | 37,51,54,55,58,59,82,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 47                                 |
| <i>Helianthus annuus</i>                       | pétalas        | 15,16,32,33,34,38,49,42,51,53,63,67,74,82,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 87                                 |
| <i>Hemerocallis disilicha</i>                  | flores         | 37,51,52,70,54,55,82,84,112                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 83                                 |
| <i>Impatiens noli me tangere</i>               | pétalas        | 13,127,131                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 87                                 |
| <i>Lilium pumilum</i>                          | flores         | 2,6,13,15,10,32,37,63,70,72,74,82, 85,113,115,116,121,122,123,124,125,128,132,134                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 65                                 |
| <i>Lilium trigritum</i> cv. "Red Night"        | anteras        | 2,13,15,10,32,37,63,70,72,74,85,95,96,107,113,115,116,121,122,123,124,125,128,140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 49                                 |
| <i>Lilium trigritum</i> cv. "Red Night"        | pétalas        | 13,32,72,77,85,121,122,123,124,125,129,133,134,135                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 49                                 |
| <i>Lilium trigritum</i> cv.                    | pétalas        | 1,2,16,38,40,41,42,82,89                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 17                                 |
| <i>Narcissus cv Golden Harvest</i>             | pétalas        | 1 <sup>A,B</sup> , 2 <sup>A</sup> , 11 <sup>A,C</sup> , 13 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 17 <sup>A</sup> , 5 <sup>A</sup> , 22 <sup>B,C,D</sup> , 24 <sup>B,C,D</sup> , 25 <sup>C</sup> , 26 <sup>A</sup> , 28 <sup>A</sup> , 37 <sup>B,C,D,E</sup> , 51 <sup>A,B,D,E</sup> , 63 <sup>A,B</sup> , 70 <sup>B,C,E</sup> , 102 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 103 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 105 <sup>A</sup>                                                                                                                                                                                                                    | 8                                  |
| <i>Narcissus poeticus</i> L.                   | partes florais | 1 <sup>A,B</sup> , 2 <sup>A</sup> , 11 <sup>A,C</sup> , 13 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 17 <sup>A</sup> , 5 <sup>A</sup> , 22 <sup>B,C,D</sup> , 24 <sup>B,C,D</sup> , 25 <sup>C</sup> , 26 <sup>A</sup> , 28 <sup>A</sup> , 37 <sup>B,C,D,E</sup> , 51 <sup>A,B,D,E</sup> , 63 <sup>A,B</sup> , 70 <sup>B,C,E</sup> , 102 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 103 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 105 <sup>A</sup>                                                                                                                                                                                                                    | 89                                 |
| <i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.            | partes florais | 1 <sup>A,B</sup> , 13 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 17 <sup>C</sup> , 22 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 23 <sup>A,B</sup> , 24 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 25 <sup>A</sup> , 26 <sup>A</sup> , 30 <sup>A,B,C</sup> , 37 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 51 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 63 <sup>B</sup> , 70 <sup>C,D</sup> , 102 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 103 <sup>A,B,C,D,E</sup> , 105 <sup>A</sup>                                                                                                                                                                                                                                          | 45,89                              |
| <i>Pastinaca sativa</i>                        | flores         | 13,32,36,37,114                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 11                                 |
| <i>Petunia hybrida</i> Vilm. "Sumer Sun"       | pétalas        | 13,37,63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 62                                 |
| <i>Petunia hybrida</i> Vilm. "Bright Yellow"   | pétalas        | 13,37                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 62                                 |
| <i>Petunia hybrida</i> Vilm. "California Girl" | pétalas        | 13,37,63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 62                                 |
| <i>Primula veris</i> L.                        | pétalas        | 13,64,66,71,72,76,83,85,86                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 71                                 |
| <i>Primula vulgaris</i>                        | pétalas        | 6,10,13,35                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 92                                 |
| <i>Ranunculus acer</i>                         | pétalas        | 37,51,54,55,58,59,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 87                                 |
| <i>Rosa foetida</i> e outras variedades        | pétalas        | 1,2,3,11,12,13,15,17,18,5,10,9,6,19,20,21,26,27,29,32,36,37,60,63,69,70,72,74,76,79,80,81,82,85,97,98,99,100,113, 115,116,109,110,111,117,118,119,120,90,92,91,93,132,107,108,95,96                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 10,21,48,50-54                     |
| <i>Sandersonia aurantiaca</i>                  | pétalas        | 13,30,31,37,63,68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 43                                 |
| <i>Tagetes erecta</i>                          | pétalas        | 13,32,36,38,39,40,41,42,43,46,47,48,60,61,62,64,65,74,82,137,138                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 2,3,14,15,23,27, 30,39,56,68,74,75 |
| <i>Taraxacum officinale</i>                    | pétalas        | 37,51,54,55,58,59,88                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 87                                 |
| <i>Tecoma stans</i>                            | pétalas        | 30,70,84                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 72                                 |
| <i>Thunbergia alata</i>                        | pétalas        | 13,37,63,82                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 44                                 |
| <i>Trollius europaeus</i>                      | flores         | 74                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 7                                  |
| <i>Tulipa</i> sp. L.                           | partes florais | 1 <sup>B,D</sup> , 2 <sup>A,B,D</sup> , 13 <sup>B,C,D,E</sup> , 17 <sup>D,E</sup> , 5 <sup>B,D,E</sup> , 22 <sup>B,C,D,E</sup> , 23 <sup>B,C,D</sup> , 24 <sup>B,C,D,E</sup> , 25 <sup>B,C,D</sup> , 26 <sup>B,D</sup> , 37 <sup>B,C,D,E</sup> , 51 <sup>B</sup> , 70 <sup>C</sup> , 102 <sup>B,C,D</sup> , 103 <sup>B,C,D</sup> , 105 <sup>B</sup>                                                                                                                                                                                                                                                        | 89                                 |

partes florais: A= perianto; B= corola; C= anteras; D= filamentos; E= estiletos e estigmas; F= sépalas; G= pétalas.

1-fitoeno; 2-fitoeno; 3-neurosporeno; 4- "semelhante a" neurosporeno; 5- $\zeta$ -caroteno; 6-lcopeno; 7-prolicopeno; 8-neo-lcopeno; 9-8-caroteno; 10- $\gamma$ -caroteno; 11- $\alpha$ -caroteno; 12- (6'-R)- $\alpha$ -caroteno; 13- $\beta$ -caroteno; 14-neo- $\beta$ -caroteno; 15-(9Z)- $\beta$ -caroteno; 16-(todo-E)- $\beta$ -caroteno; 17- $\beta$ -zeacaroteno; 18-zeacaroteno; 19-10'-apolicopeno-10'-ol; 20-10'-apolicopeno-10'-deído carboxílico; 21-10'-apo- $\beta$ -caroteno-10'-ol; 22-5,6-monopóximo- $\beta$ -caroteno; 23-(2'-5,6,5',6'-diépóximo- $\beta$ -caroteno; 24-(E)-5,6,5',6'-diépóximo- $\beta$ -caroteno; 25-5,6,5',6'-diépóximo- $\beta$ -caroteno II; 26-mutacoteno; 27-rubixantina; 28- "semelhante a" rubixantina; 29-Z-rubixantina (gazaniaxantina); 30-cripoxantina; 31-éster de cripoxantina; 32- $\beta$ -cripoxantina; 33-(13Z)- $\beta$ -cripoxantina; 34-(Z)- $\beta$ -cripoxantina; 35-éster de  $\beta$ -cripoxantina; 36- $\alpha$ -cripoxantina; 37-luteína; 38-(todo-E)-luteína; 39-(todo-E,3R,3'R,6'R)-luteína; 40-(9Z)-luteína; 41-(9Z)-luteína; 42-(13Z)-luteína; 43-(9Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 44-(9Z,9Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 45-(9Z,9Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 46-(13Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 47-(13Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 48-(13Z,13Z,3R,3'R,6'R)-luteína; 49-monóster de (E)-luteína; 50-diéster de (E)-luteína; 51-épóximo de luteína; 52-(Z)-épóximo de luteína; 53-(13Z)-épóximo de luteína; 54-épóximo de neoluteína A; 55-épóximo de neoluteína B; 56-diéster de neoluteína B; 57-monóster de neoluteína B; 58-neoluteína A; 59-neoluteína B; 60-3'-epiluteína; 61-(todo-E)-3'-epiluteína; 62-anidroluteína; 63-zeaxantina; 64-(todo-E)-zeaxantina; 65-(todo-E,3R,3'R)-zeaxantina; 66-(9Z)-zeaxantina; 67-(13Z)-zeaxantina; 68-éster de zeaxantina; 69-10'-apo-zeaxantina-10'-ol (galoxantina); 70-antexantina; 71-(todo-E)-antexantina; 72-(9Z)-antexantina; 73-taraxantina; 74-neoxantina; 75-(6R todo-E)-neoxantina; 76-(todo-E)-neoxantina; 77-(9Z)-neoxantina; 78-(9Z)-neoxantina; 79-(todo-E)-neocromo; 80-(8'S)-neocromo; 81-(8'R)-neocromo; 82-violaxantina; 83-(todo-E)-violaxantina; 84-(Z)-violaxantina; 85-(9Z)-violaxantina; 86-di-Z-(9,9')-violaxantina; 87-(13Z)-violaxantina; 88-violaxantina; 89-violaxantina; 90-(8R)-luteoxantina; 91-(8'R)-luteoxantina; 92-(8S)-luteoxantina; 93-(8'S)-luteoxantina; 94-(13Z,8'R)-luteoxantina; 95-(9Z,8'R)-luteoxantina; 96-(9Z,8'S)-luteoxantina; 97-sinexantina; 98-(9Z,8R)-sinexantina; 99-(9Z,8S)-sinexantina; 100-rosafeno; 101-diéster de asiexantina; 102-chrysanthemaxantina; 103-flavoxantina; 104- "semelhante a" flavoxantina; 105-auroxantina; 106-Z-auroxantina; 107-(8R,8'S)-auroxantina; 108-(8R,8'S)-auroxantina; 109-(8S,8'S)-auroxantina; 110-(8S,8'R)-auroxantina; 111-(9Z,8R,8'R)-auroxantina; 112-3,3'-didroxi-luteocromo; 113- $\beta$ -citraurina; 114-mutaloxantina; 115-(8S)-mutaloxantina; 116-(8R)-mutaloxantina; 117-latexantina; 118-(9Z)-latexantina; 119-(8'S)-latexantina; 120-(8'R)-latexantina; 121-capsantina; 122-(9Z)-capsantina; 123-(9Z)-capsantina; 124-(13Z)-capsantina; 125-(13'Z)-capsantina; 126-(9Z)-capsantina; 127-(3R,3'S,5'R)-éster de capsantina; 128-capsorubim; 129-(13Z)-capsorubim; 130-(9Z)-capsorubim; 131-(3S,5R,3'S,5'R)-éster de capsorubim; 132-karboxantina; 133-5,6-diacarboxantina; 134-6-epikarboxantina; 135-5,6-diacarboxantina; 136-cantaxantina; 137-3-hidroxi- $\beta$ -e-caroteno-3'-ona; 138-e-e-caroteno-3'-diol; 139-(todo-E,3S,3R,3'S)-4'-5-retro- $\beta$ -e-caroteno-3,5,3'-trio; 140-lilixantina; 141-flavocromo; 142-galenina; 143-valentianina; 144-microxantina; 145-citroxantina; 146-antexantina; 147-cauxantina.



As flores de *T. erecta* contêm grandes quantidades de xantofilas aciladas com ácidos graxos (Alam et al., 1968a). Os ácidos graxos identificados através de cromatografia gasosa foram o palmítico (60,4%), mirístico (22,6%), esteárico (14,4%), laurico (2,4% do total) e traços de oléico (Alam et al., 1968b). A xantofila principal foi identificada como sendo luteína na forma esterificada (Quackenbush e Miller, 1972): luteína dipalmitato (56% do total de ésteres de luteína), dimiristato (36%) e monomiristato (8%) (Philip e Berry, 1975).

Análises posteriores através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de espectrometria de massas conseguiram discriminar ésteres mistos de não misto em um extrato pré-purificado de pétalas de *T. erecta* (Gau et al., 1983). Os ésteres de luteína identificados foram dimiristato (12,6%), miristato-palmitato (24,7%), dipalmitato (35,5%), palmitato-estearato (14,4%), diestearato (2,4%) e um éster não identificado (2,1%). Resultados semelhantes foram obtidos na análise do pó das pétalas (Rivas, 1989). As concentrações de ésteres de luteína em pétalas de *T. erecta* em diferentes estágios de desenvolvimento variaram consideravelmente (Gregory et al., 1986). O total de luteína passou de 3,83 µg/g nas pétalas amarelas esverdeadas para 791,09 µg/g no estágio mais avançado (pétalas laranja amarronzado) (Tabela 2).

**Tabela 2- Concentração de ésteres de luteína nas flores de *Tagetes erecta***

| Coloração das flores | Ésteres de Luteína (µg/g) |                     |             |                     | Total  |
|----------------------|---------------------------|---------------------|-------------|---------------------|--------|
|                      | Dimiristato               | Miristato-Palmitato | Dipalmitato | Palmitato-Estearato |        |
| Amarelo esverdeado   | —                         | 1,53                | 1,82        | 0,48                | 3,83   |
| amarelo brilhante    | —                         | 2,74                | 5,29        | —                   | 8,03   |
| amarelo              | —                         | 4,61                | 82,17       | 91,93               | 178,71 |
| laranja              | 0,41                      | 116,46              | 202,87      | —                   | 323,40 |
| laranja              | —                         | 101,78              | 205,59      | 91,45               | 398,82 |
| laranja forte        | 48,79                     | 245,08              | 373,98      | 1,40                | 669,25 |
| laranja amarronzado  | 30,29                     | 356,39              | 404,41      | —                   | 791,09 |

Fonte: Gregory et al. (1986).

Delgado-Vargas e Paredes-Lopez (1996) analisaram o extrato não saponificado e saponificado da farinha de flores de *T. erecta* e observaram que no primeiro havia diferentes isômeros de ésteres de luteína com predominância da forma todo-*E*, enquanto que o segundo era constituído por quatro isômeros de luteína na forma livre. Estes isômeros foram identificados, tentativamente, como 13'-Z- (13'-*cis*-), 13Z-, todo-*E*- e 9Z- ou 9'-Z-luteína. Estes

mesmos autores (1997a) confirmaram a identificação da maioria destes isômeros e identificaram, tentativamente, todo-*E*-zeaxantina. Foram ainda verificados os efeitos do conteúdo de sólidos e da eliminação de substâncias aquossolúveis sobre o perfil destes pigmentos em amostras de *T. erecta* tratadas com enzimas. O tratamento enzimático aplicado não causou variação na distribuição em porcentagem dos isômeros de luteína e a eliminação de substâncias aquossolúveis teve efeito significativo, mas pequeno sobre tais variações. Por outro lado, o teor de sólidos afetou o perfil destes isômeros; o tratamento enzimático sobre uma mistura contendo 5% de sólidos produziu uma amostra com conteúdo mais elevado de todo-*E*-luteína.

Delgado-Vargas e Paredes-Lopez (1997b) estudaram o efeito de tratamentos enzimáticos sobre a extração dos carotenóides de flores de *T. erecta*. Foram testadas cinco enzimas comerciais, todas de origem fúngica e de atividade mista. Entre estas enzimas, a Econase-cep (uma preparação de celulase com atividades endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, celobiohidrolase, exo-1,4- $\beta$ -D-glucosidade, hemicelulase,  $\beta$ -glucanase, protease e amiloglucosidade, descrita em Delgado-Vargas e Paredes-Lopez, 1997a) mostrou os melhores resultados. Quando foi empregada na concentração de 0,1% p/p aumentou a extração de carotenóides totais de 1,7 para 7,4 mg/g de flores secas. Entretanto este efeito só foi observado quando hexano foi usado como solvente de extração. Quando a extração foi realizada segundo os métodos da AOAC (1984) e AOAC modificado (com pré-eliminação de substâncias aquossolúveis), onde solventes mais polares foram usados, o efeito enzimático foi mascarado e a extração foi muito mais eficiente, atingindo valores de 12,3 e 13,3 mg/g, respectivamente.

Khachik et al. (1999) isolaram e elucidaram a estrutura absoluta da luteína de *T. erecta* como (13Z,13'Z,3R,3'R,6'R)-luteína e observaram a presença de 3-hidróxi- $\beta$ , $\epsilon$ -caroten-3'-ona e 3'-epiluteína em extratos saponificados desta flor. Outros carotenóides identificados, inclusive todo-*E*-zeaxantina, estão relacionados na Tabela 1.

A presença de epóxidos e produtos de oxidação de luteína em extratos de flores de *T. erecta* já foi citada (Alam et al., 1968a; Goodwin, 1980). Valadon e Mummery (1967) concluíram que luteína e zeaxantina constituíam no máximo 10% dos carotenóides em *T. erecta*, enquanto que os epoxicarotenóides eram os pigmentos principais. Posteriormente, em 17 análise do extrato destas flores, constatou-se que 88 a 92% dos pigmentos eram luteína (predominantemente) e zeaxantina, e que menos de 3% eram epóxidos (Quackenbush e Miller (1972). Não foi encontrada diferença significativa entre a composição de extratos de *T. erecta* processados e não processados. Em trabalho mais recente de Mcgeachin e Bailey (1995), a presença de violaxantina e neoxantina em um extrato de *T. erecta* foi relatada.



Hadden et al. (1999) determinaram a composição de carotenóides em um extrato comercial de flores de *T. erecta* contendo 4,5% de luteína na forma de ésteres. Após a saponificação deste extrato, verificou-se que 93% dos pigmentos eram biologicamente utilizáveis (não oxidados). Destes, 88% eram compostos por luteína na forma todo-*E*, pequenas quantidades da forma *Z* e resíduos da forma esterificada. O extrato continha ainda 5% de todo-*E*- e *Z*-zeaxantina, outros carotenóides minoritários e níveis insignificantes de produtos de degradação da luteína. A composição encontrada enfatizou a importância da utilização dos extratos comerciais de *T. erecta* em suplementos nutricionais e como corante em rações, pois mostrou que as formas de luteína biologicamente utilizáveis eram predominantes, enquanto que os níveis dos produtos de degradação da luteína estavam abaixo do esperado.

O uso das flores de *T. erecta* está diretamente associado ao seu elevado conteúdo de luteína. Palmer havia mencionado desde 1915 que a coloração amarela da pele de galinhas era, em parte, decorrência da presença de xantofilas em suas rações. Alam et al. (1968c) adicionaram pétalas de *T. erecta* nas rações de aves poedeiras e observaram que enquanto o conteúdo de pigmento nas gemas dos ovos e nos órgãos das aves aumentava com o acréscimo das quantidades adicionadas à dieta, a eficiência da utilização destes pigmentos diminuía. Uma coloração ideal das gemas foi obtida com a adição de 33 mg de pigmento/kg de dieta básica. Com estes resultados, foi sugerida a utilização das pétalas de *T. erecta* como fonte concentrada de xantofilas para pigmentar as rações de aves domésticas. Guenther et al. (1973) compararam a eficiência do uso de luteína pura e de extratos naturais contendo este pigmento na coloração da gema de ovos e concluíram que o segundo era melhor utilizado pelas galinhas. Philip e Berry (1975) sugeriram que a presença de luteína na forma esterificada nos extratos de flores de *T. erecta* e sua maior solubilidade em lipídios poderiam ter sido os fatores responsáveis pelos resultados de Guenther et al. A elevada solubilidade dos ésteres de luteína em óleo vegetal (comparado com a pobre solubilidade dos carotenóides sintéticos) e o fato da luteína livre e esterificada serem carotenóides comuns em plantas comestíveis foram parâmetros relevantes citados por Philip e Berry (1975) para aplicação comercial de ésteres de xantofilas para colorir alimentos. Em 1976a, Philip et al. montaram um experimento com galinhas poedeiras e compararam a utilização biológica de ésteres de luteína de diferentes fontes, inclusive de pétalas de *T. erecta*, com a luteína cristalina. Os resultados confirmaram que a luteína acilada é melhor utilizada pelas aves e mostraram que a solubilidade de xantofilas em lipídios é um pré-requisito para sua absorção. Observou-se ainda que, as aves desacilam a luteína antes de depositá-la nos óvulos em desenvolvimento.

Um processo para purificação de ésteres de luteína de pétalas de *T. erecta*, baseado na precipitação com isopropanol, foi desenvolvido por Philip e Berry em 1976(b). Os ésteres de luteína precipitados foram solúveis em óleo vegetal na extensão de 20% p/p a 60°C. De acordo com suas concentrações, os ésteres de luteína produziram uma coloração que variou de amarelo a laranja brilhante quando aplicados sobre celulose microcristalina. A adição de carotenóides sintéticos ( $\beta$ -apo-8'-carotenal e cantaxantina) aos ésteres de luteína produziu uma coloração vermelha; porém esta adição ficou limitada a solubilidade destes pigmentos em lipídios.

O suco de laranja e outras bebidas cítricas podem ser adulterados com o extrato de flores de *Tagetes* para elevar os seus teores de carotenóides e intensificar as suas cores. Wild e Dobrovolny (1976) desenvolveram um método por CLAE que permite identificar a presença de extrato de *Tagetes* em produtos cítricos adulterados. O método é recomendado para análise rotineira.

As propriedades biológicas da luteína extraída das flores de *T. erecta* foram constatadas em diversos estudos. Por exemplo, essa luteína inibiu a atividade mutagênica de 1-nitropireno em *Salmonella typhimurium*, provavelmente pela formação de um complexo entre a luteína e o 1-nitropireno, o qual poderia limitar a biodisponibilidade deste último (Mejía et al., 1997). Em um outro estudo, a luteína de extratos de *T. erecta* supriu o crescimento de tumores mamários e realçou a proliferação de linfócitos em ratos (Chew et al., 1996; Park et al., 1997). Com humanos foi demonstrado que ésteres de luteína de extratos de *T. erecta* são absorvidos eficientemente na corrente sanguínea (Bowen et al., 1997). Esse resultado foi reforçado por um outro experimento no qual houve um aumento nos níveis de luteína no plasma e na densidade óptica do pigmento macular após a ingestão de luteína extraída de flores de *T. erecta* (Landrum et al., 1997). O benefício destes efeitos foi demonstrado por estudos epidemiológicos que constatarem uma relação inversa significativa entre o consumo de luteína e zeaxantina (Seddon et al., 1994) ou níveis plasmáticos destes carotenóides (EDDC, 1993) e o risco de degeneração macular. Embora as flores de *T. erecta* sejam usadas na medicina mexicana tradicional (Neher, 1968; Mendieta e Del-Amos, 1981), as mesmas não são empregadas freqüentemente na medicina convencional. Um dos raros exemplos é o agente oftalmológico (Adaptinol), extraído de pétalas desta flor e constituído principalmente de luteína dipalmitato (Gau et al., 1983).

Uma revisão sobre os diversos usos de diferentes espécies da planta *Tagetes*, inclusive *T. erecta*, pode ser encontrada em Szabo e Papp (1975) e Vasudevan et al. (1997).

## 2.2. *Adonis aestivalis*

Kamata (1986) extraiu diésteres de astaxantina de flores de *Adonis aestivalis* e verificou que a astaxantina nestes compostos apresentava-se, principalmente, na configuração (3*S*, 3'*S*). Os ácidos graxos dos diésteres de astaxantina foram identificados como C18:1, C16:0, C14:0, C18:3, C12:0 e C18:2. Kamata et al. (1990a) utilizaram as flores ou extratos de flores de *A. aestivalis* para alimentar dois grupos de trutas com uma dieta de 10 mg de pigmento para cada 100 g. Após duas semanas, o grupo alimentado com as flores morreu vítima de enterite. No grupo alimentado com os extratos destas flores, não houve mortalidade por mais de três meses e os peixes exibiram uma coloração rosa brilhante. Como os resultados sugeriram a presença de componente tóxico nas flores, mas não nos extratos, os autores recomendaram apenas a utilização do último como fonte de pigmentos para as trutas. Kamata et al. (1990b) estudaram a composição de ácidos graxos dos diésteres de astaxantina de trutas alimentadas com extratos de flores de *A. aestivalis* e constataram que os ácidos graxos majoritários eram C18:1 (31,8% do total) e C22:6 (13,1%). A composição encontrada foi completamente diferente daquela observada para os diésteres de astaxantina dos extratos de flores. Os autores sugeriram que os diésteres de astaxantina das flores, ao serem ingeridos pelas trutas, eram absorvidos, hidrolisados, transferidos para os tecidos e reesterificados.

Schersl (1995) extraiu a astaxantina e seus ésteres de flores frescas ou parcialmente desidratadas de *A. aestivalis*, utilizando a técnica de extração supercrítica. Um pré-tratamento com HCl 0,1N a 100°C por poucos minutos ou na presença de uma enzima que rompia a parede celular melhorava a eficiência da extração.

## 2.3. *Brassica napus*

Das pétalas amarelas de flores de *Brassica napus* foram isolados cinco carotenóides majoritários: 9'*Z*-neoxantina, todo-*E*- e 9*Z*-violaxantina e (8'*R*)- e (8'*S*)-luteoxantina (Debrunner e Pfander, 1991). Uma análise mais detalhada revelou pelo menos 80 tipos de carotenóides, incluindo carotenos, xantofilas altamente oxigenadas e a ocorrência natural *E/Z*-isômeros (Kull e Pfander, 1995b). Os carotenóides majoritários identificados na parte polar do extrato foram (8'*R*)-, (8'*S*)- e (13*Z*,8'*R*)-luteoxantina, flavoxantina/crisantemaxantina, taraxantina, e todo-*E*-, 9*Z*- e 13*Z*-violaxantina. A estrutura dos isômeros (9*Z*,9'*Z*,3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína e (13'*Z*,3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína de pétalas de flores de *B. napus* foi elucidada posteriormente (Kull e Pfander, 1997).

## 2.4. *Calendula officinalis*

Abou-El-Maati e Abd-Ellatif (1992) analisaram os carotenóides das flores de *Calendula officinalis* e identificaram  $\beta$ -caroteno, licopeno, violaxantina, anterxantino e canxantina. O  $\beta$ -caroteno foi o mais abundante, contribuindo com 22,9% do total. Neste mesmo trabalho, os pigmentos de flores de *C. officinalis* foram testados para colorir bebidas e sucos. Observou-se que a acetona (95%) foi o solvente mais efetivo na extração dos carotenóides, que o melhor veículo para dispersá-los foi uma solução amido e que a retenção da cor foi melhor nos produtos mantidos sob refrigeração. El-Hashmy e colaboradores (1986) já haviam isolado e purificado o  $\beta$ -caroteno de flores secas e frescas de *C. officinalis*.

Valdés e García (1999) publicaram uma revisão sobre *C. officinalis* abordando aspectos farmacognósticos, químicos e farmacológicos. Os carotenóides incluídos na compilação foram  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epoxi-caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno, mutatoxantina e epóxido de luteína.

## 2.5. *Chrysanthemum cinerariaefolium*

As flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* são fonte de um extrato de um inseticida natural, cuja cor é conferida por carotenóides e clorofilas (Head, 1973). A existência de  $\beta$ -caroteno neste extrato foi relatada por Subbarantnam e Parsameswaran Pillay (1947). Um dos sub produto do processo de refinação deste extrato foi usado como fonte de xantofilas em rações de galinhas (Head, 1966; Plebluda et al., 1966)

A composição de carotenóides em sete estágios de desenvolvimento de flores de *C. cinerariaefolium* foi examinada, desde o botão ainda fechado até que a flor atingisse um estado de senescência avançado (Head, 1973). Nas flores em estágio inicial de desenvolvimento, cerca de 38% do total de carotenóides estavam associados com o pólen, o qual era rico em Z-luteína. Em todas as etapas de crescimento, os E- e Z-luteína na forma de diésteres (principalmente), monoésteres e livre foram os constituintes mais abundantes. O total de carotenóides no primeiro estágio foi de 6,9  $\mu\text{g}$  (79,9% de luteína) e no terceiro de 97,8  $\mu\text{g}$  (92,3% de luteína). Nos estágios seguintes o total de carotenóide diminuiu e atingiu 13  $\mu\text{g}$  na fase de senescência avançada.

## 2.6. *Delonix regia*

*Delonix regia* é uma árvore ornamental bastante resistente que cresce na maioria dos países tropicais e que apresenta flores abundantes de coloração laranja avermelhada que são ricas em carotenóides (1890  $\mu\text{g/g}$  flores frescas (Thakur e Arya, 1989)). O  $\beta$ -caroteno

constitui cerca de 35% do total de carotenóides presentes nestas flores (Premachandra et al., 1978). Os carotenóides presentes nas pétalas, sépalas, filamentos e anteras destas flores foram determinados (Jungalwala e Cama, 1962). Nas pétalas e sépalas, os carotenos foram os mais abundantes, enquanto que nas anteras e filamentos foram as xantofilas. A Tabela 3 mostra o conteúdo total de carotenóides nestas partes florais e as porcentagens dos principais carotenóides. O número total de carotenóides isolados nas pétalas, sépalas, filamentos e anteras foi de 29, 18, 20 e 10, respectivamente, (Tabela 1).

As gemas de ovos de aves que foram alimentadas com ração enriquecida com vitamina A sintética apresentou coloração pálida, traços de  $\beta$ -caroteno e 6 UI/g de vitamina A (Premachandra et al., 1978). Quando a vitamina A sintética foi substituída por 5% de pétalas desidratadas de flores de *D. regia*, as gemas exibiram uma coloração alaranjada e o teor de  $\beta$ -caroteno e de vitamina aumentou para 6  $\mu\text{g/g}$  e 13 UI/g, respectivamente. Os autores do estudo não mencionaram efeitos tóxicos e recomendaram a utilização preferencial das pétalas desidratadas de *D. regia*.

A estabilidade dos carotenóides de flores de *D. regia* e do  $\beta$ -caroteno sintético foi avaliada em celulose microcristalina, em éter de petróleo e em sistemas coloidais aquosos representados por polpas de frutas trituradas (Thakur e Arya, 1989). Os carotenóides das flores foram bem mais estáveis que o  $\beta$ -caroteno sintético nos dois primeiros veículos, mas em sistemas coloidais aquosos foram apenas ligeiramente mais estáveis. Neste último veículo, a estabilidade dos carotenóides dependia do uso de um conservante; na presença de  $\text{SO}_2$  ou ácido ascórbico, os níveis de carotenóides foram os mais elevados, enquanto que as amostras tratadas com sorbato apresentaram os menores níveis. Uma vez que o  $\beta$ -caroteno é o principal carotenóide de flores de *D. regia*, sugeriu-se que a maior estabilidade dos carotenóides destas flores em relação ao  $\beta$ -caroteno sintético poderia ser atribuída à presença de antioxidantes naturais ou de lipídios em seu extrato. A última opção foi descartada, pois os extratos saponificados continuaram a apresentar maior estabilidade que o  $\beta$ -caroteno sintético. Os autores sugeriram que os extratos de flores de *D. regia* poderiam ser comercializados facilmente na forma de um concentrado oleoso, mas só depois de uma avaliação toxicológica completa.

**Tabela 3- Distribuição (%) dos carotenóides principais nas partes florais de *Delonix regia***

| Parte Floral | Carotenóides |            |                        |                            |         |         |            |                  | Total (µg/g fresco/seco) |
|--------------|--------------|------------|------------------------|----------------------------|---------|---------|------------|------------------|--------------------------|
|              | β-caroteno   | γ-caroteno | E- e Z-<br>rubixantina | isômeros<br>de<br>licopeno | fitoeno | luteína | zeaxantina | E- e Z-βcaroteno |                          |
| Pétalas      | 34,0         | 11,2       | 15,1                   | 11,0                       |         |         |            |                  | 188 / 1290               |
| Sépalas      | 32,8         |            |                        |                            | 36,6    |         |            |                  | 155 / 975                |
| Filamentos   |              |            |                        |                            | 12,0    | 21,7    | 15,2       | 14,0             | 51 / 360                 |
| Anteras      | traços       |            |                        |                            |         |         | 90,0       | traços           | 1904 / 5701              |

Fonte: Jungalwala e Cama, 1962.

## 2.7. *Dendrobium* (Orchidaceae)

Quatro carotenóides majoritários foram isolados de pétalas amarelas de flores de algumas espécies e híbridos de *Dendrobium* (Orchidaceae): luteína, violaxantina, neoxantina e β-caroteno, sendo o primeiro o mais abundante e o principal responsável pela cor amarela de todas as espécies analisadas (Thammasiri et al., 1984).

## 2.8. *Eschscholtzia californica*

A análise das pétalas das flores amarelas de *Eschscholtzia californica* revelou um novo retro-carotenóide, identificado como todo-*E*-(3*S*,5*R*,3'*S*)-4',5-retro-β,β-caroteno-3,5,3'-triol (Maoka et al., 2000).

## 2.9. *Helianthus annuus*, *Impatiens noli me tangere*, *Ranunculus acer*, *Taraxacum officinale*

A composição qualitativa dos carotenóides nas pétalas amarelas de flores de *Helianthus annuus*, *Impatiens noli tangere*, *Ranunculus acer* e *Taraxacum officinale* foi praticamente a mesma, sendo a luteína e o epóxido de luteína os carotenóides principais (Tóth e Szabolcs, 1970). Na maioria das espécies, estes dois pigmentos estavam presentes em diferentes formas geométricas. O β-caroteno foi encontrado em pequenas quantidades, enquanto que traços de zeaxantina estavam presentes ocasionalmente. A distribuição dos carotenóides em flores de *H. annuus* e *T. officinale* coletadas da mesma região, mas em diferentes períodos do ano, não variou.



### 2.10. *Hemerocallis disticha*

Através da técnica de CLAE, 21 carotenóides foram separados do extrato de flores de *Hemerocallis disticha*, dos quais 14 foram identificados (Tai e Chen, 2000). A estabilidade destes carotenóides foi avaliada durante a secagem com ar quente (50°C) ou por liofilização, com uma parte da amostra deixada previamente em solução de sulfito de sódio (1%) por 4 h. Independentemente do tratamento de secagem usado, os níveis de carotenóides foram maiores nas flores pré-tratadas com solução de sulfito de sódio. A secagem usando ar quente produziu uma maior quantidade de Z-carotenóides nas flores que haviam sido tratadas com sulfito de sódio, enquanto que a liofilização provocou alteração mínima nas amostras com ou sem tratamento prévio. A secagem a seco provocou também maiores perdas de carotenóides que a liofilização.

### 2.11. *Lathyrus aphaca*

O conteúdo de carotenóides nas pétalas de flores amarelas de *Lathyrus aphaca* foi estimado em 1% em relação ao seu peso seco (Markham e Hammett, 1994), mas não houve identificação destes pigmentos.

### 2.12. *Lilium pumilum*

*Lilium pumilum* é uma das mais belas plantas da Mongólia, a qual cresce nas montanhas e floresce no mês de junho, exibindo flores com pétalas de 4 a 5 cm de comprimento e de um vermelho profundo. Os bulbos desta planta são comestíveis e suas flores são usadas para combater a hemorragia na medicina popular. O conteúdo total de carotenóides encontrados nas flores secas foi de cerca de 20 mg/g (Partali et al., 1987) e os carotenóides isolados foram  $\beta$ -caroteno (0,3% do total de carotenóides), ésteres de (3S,5R,3'S,5'R)-capsorubina (88%) e ésteres de (3R,3'S,5'R)-capsantina (11%).

### 2.13. *Lilium trigrinum* cv. "Red Night"

Um total de 29 carotenóides foi encontrado nas pétalas e anteras de *Lilium trigrinum* cv. "Red Night" (Märki-Fischer e Eugster, 1985). Dentre estes pigmentos, (9'Z)-, (9Z)-, (13'Z)- e (13Z)-capsantina, 6-epikarpoxantina, karpoxantina e lilixantina foram isolados pela primeira vez. O carotenóide principal nas pétalas e anteras foi capsantina (39%) e (9Z)-anteraxantina (57%), respectivamente. Um carotenóide desconhecido, presente em quantidade extremamente pequena, foi também isolado e presumiu-se que este pigmento continha um grupo 3,5,6-triidroxi-5,6-dehidro- $\beta$ - e um grupo  $\kappa$  terminal. Entretanto, a determinação



conclusiva da estrutura do composto não foi possível devido a sua baixa concentração. Posteriormente, Deli et al. (1998), isolando e caracterizando 3,5,6-triidroxicarotenóides de pétalas de *L. trigrinum*, encontraram o 5,6-diacapsokarpoxantina ((3*S*,5*S*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-deidro-3,5,6,3'-tetraidroxi- $\beta$ , $\kappa$ -carotenona 6') e sugeriram que o mesmo poderia corresponder ao pigmento não identificado por Märki-Fischer e Eugster (1985). Outros carotenóides identificados pela primeira vez nas pétalas de *L. trigrinum* foram 5,6-diakarpoxantina, 9*Z*-neoxantina, 9*Z*- e 13*Z*-capsorubina.

#### 2.14. *Narcissus* cvv “Golden Harvest”

A todo-*E*-luteína foi o carotenóide mais abundante nas pétalas amarelas de flores de um híbrido de *Narcissus* cvv “Golden Harvest”. Os carotenóides minoritários isolados foram fitoeno, fitoflueno, todo-*E*- $\beta$ -caroteno, 9*Z*-luteína, 9'*Z*-luteína, 13*Z*-luteína, violaxantina e luteoxantina (Berset e Pfander, 1985).

#### 2.15. *Narcissus poeticus* L., *Narcissus pseudonarcissus* L. e *Tulipa* sp. L.

Valadon e Mummery (1968) investigaram distribuição de carotenóides em diferentes partes florais de *Narcissus poeticus*, *Narcissus pseudonarcissus* e *Tulipa* sp. A cor amarela ou laranja das partes florais analisadas dependeu do tipo e quantidade dos carotenóides majoritários, do conteúdo total de carotenóides, e também da presença de outros pigmentos.

Os totais de carotenóides e os principais carotenóides nos periantos, corolas, anteras, estigmas e estiletos destas flores estão apresentados na Tabela 4. Quanto à presença de carotenóides nos filamentos destas flores, observou-se que os de *Tulipa* sp (cor laranja intensa) continham o dobro do total de carotenóide obtido para os filamentos laranjas de *N. poeticus*, e sete vezes mais que o obtido para os filamentos amarelos de *N. pseudonarcissus*. O carotenóide majoritário nos dois últimos casos foi a luteína, enquanto que o diepoxi- $\beta$ -caroteno era o mais abundante no primeiro.

Lützow et al. (1996), isolando os cromoplastos das pétalas de *N. pseudonarcissus*, constatarem a presença de violaxantina e mostraram que sob determinadas condições de análise este pigmento era convertido ao retro-carotenóide (3*S*,5*R*,3'*S*,5'*R*,todo-*E*)5,5'-diidro-3,5,3',5'-tetraidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno.

**Tabela 4- Distribuição (%) dos carotenóides nas partes florais das Flores *Narcissus poeticus* L., *Narcissus pseudonarcissus* e *Tulipa* sp**

| Carotenóides          | <i>Narcissus poeticus</i> L. |        |        |                      | <i>Narcissus pseudonarcissus</i> |        |        |                      | <i>Tulipa</i> sp |        |         |         |
|-----------------------|------------------------------|--------|--------|----------------------|----------------------------------|--------|--------|----------------------|------------------|--------|---------|---------|
|                       | perianto                     | corola | antera | estima e<br>estilete | perianto                         | corola | antera | estima e<br>estilete | perianto         | corola | Anteras | estigma |
| β-caroteno            |                              | 50     | 60     | *                    |                                  | 34     | 25     |                      |                  |        |         |         |
| epóxido-β-caroteno    |                              |        |        |                      |                                  |        |        |                      |                  |        |         |         |
| epóxidos-β-caroteno   |                              |        | 22     |                      |                                  |        | 27     |                      | 73               |        | 70      |         |
| diepóxi-β-caroteno    |                              |        |        |                      | 25                               |        |        |                      |                  |        |         |         |
| epóxidos hidroxilados |                              |        | 14     |                      |                                  |        |        |                      |                  |        | 26      |         |
| β-criptoxantina       |                              |        |        |                      |                                  |        | 26     |                      |                  |        |         |         |
| luteína               | 49                           |        |        | *                    | 15                               |        |        | *                    |                  |        |         | *       |
| Total (mg/g)          | 3,4                          | 17,7   | 0,3    | 4,9                  | 2,4                              | 2,8    | 1      | 0,5                  | 6,1              | —      | 1       | 0,2     |

\* Carotenóides principais. Fonte: Valadon e Mummery (1968).

## 2.16. *Parkinsonia aculeata* L. e *Pongamia pinnata* Vent.

Estudando as características físicas e bioquímicas das flores de *Parkinsonia aculeata* L. e *Pongamia pinnata* Vent., Jain e Dhingra (1991) mostraram, através de análise colorimétrica, que a primeira apresentava um conteúdo bem maior de carotenóides. As medidas de absorvância do extrato de *P. aculeata* L. a 420 e a 450 nm foram de 0,236 e 0,067 unidades de absorvância (UA), respectivamente, enquanto que para *P. pinnata* Vent. a absorvância nestes mesmos comprimentos de onda foi de 0,005 UA.

## 2.17. *Pastinaca sativa*

Os carotenóides isolados de extratos de flores amarelas de *Pastinaca sativa* foram luteína (majoritária), β-caroteno, mutatoxantina e dois outros identificados, tentativamente, como β- e α-criptoxantina (Carrol et al., 1997).

## 2.18. Cultivares de *Pelargonium*

Mitchell et al. (1998) estudaram flores de diferentes espécies e cultivares de *Pelargonium* com coloração variando de creme e rosa a roxo forte, passando pelo salmão, laranja e vermelho. Enquanto os flavonóides ou carotenóides foram os responsáveis pela coloração creme/amarela, as demais cores resultaram de misturas de antocianinas. As amostras que continham carotenóides foram *P. luridum* (0,11 UA), *P. appendiculatum* (L.f.) (0,14 UA), *P. alchemilloides* (L.) L'Hérit (0,14 UA), *P. aridum* R. A. Dyer (0,20 UA), *P. triste* (L.) L'Hérit

(<0,01 UA), "Thompson Morgan" (<0,01 UA) e 'PAC®Botham's Surprise' (<0,01 UA). As absorvâncias foram medidas em comprimentos de onda máximos e os extratos eram constituídos por 50 mg de peso seco de pétalas em 20 ml de solvente.

Mitchell et al. (1998) concluíram que os tipos e os níveis de pigmentos presentes eram os fatores mais importantes pela variação de cores nas diferentes espécies.

#### **2.19. *Petunias hybrida* Vilm.**

Os carotenóides isolados das pétalas de três cultivares de petúnias amarelas ("Summer Sun", "Bright Yellow" e "California Girl") foram  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina (Nielsen e Bloor, 1997). As mudanças nas concentrações destes pigmentos, desde a fase de botão até a flor madura, foram acompanhadas. Na cultivar "Summer Sun" o amadurecimento da flor provocou um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -caroteno, enquanto que os níveis de zeaxantina se mantiveram e os de luteína tenderam a diminuir. Na cultivar "Bright Yellow" a zeaxantina não foi detectada, o conteúdo de  $\beta$ -caroteno não variou significativamente e os níveis de luteína diminuíram bastante. Já na cultivar "California Girl" os níveis destes três pigmentos aumentaram. Nas pétalas maduras dos três cultivares que exibiam uma coloração mais intensa os níveis de xantofilas e  $\beta$ -caroteno foram maiores do que naquelas onde a coloração era mais suave.

#### **2.20. *Primula veris* L.**

Os carotenóides isolados das pétalas de *Primula veris* L. foram 9Z-, di-Z-(9 ou 9')- e todo-*E*-violaxantina,  $\beta$ -caroteno, 9Z- e todo-*E*-zeaxantina, 9Z- e todo-*E*-antheraxantina, todo-*E*-neoxantina e Z- e *E*-luteoxantina (Pöhm, 1983), sendo os dois últimos provavelmente artefatos. Os isômeros de violaxantina constituíram cerca de 75% do total de carotenóides.

#### **2.21. *Primula vulgaris***

Zonta et al. (1987) analisaram extratos de pétalas de *Primula vulgaris* com o objetivo de separar xantofilas livres e esterificadas por CLAE. O extrato não saponificado continha basicamente licopeno,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e vários carotenóides esterificados. No extrato saponificado foram observados novos picos de xantofilas livres, correspondentes às formas esterificadas. Entretanto, apenas uma destas xantofilas foi identificada como sendo  $\beta$ -criptoxantina. De acordo com a ordem de eluição dos pigmentos na coluna, as demais xantofilas livres eram mais polares que a  $\beta$ -criptoxantina.

### 2.22. *Pyrostegia venusta*

*Pyrostegia venusta* é uma planta trepadeira invasora nativa muito conhecida no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (Gobatto-Rodrigues e Stort, 1992), que geralmente apresenta flores laranjas. Entretanto, Gusman e Gottsberger (1996) observaram uma pequena população onde os indivíduos apresentavam flores amarelas. Estes autores determinaram o conteúdo total de carotenóides nas flores amarelas e laranjas de *P. venusta* e encontraram 0,87 e 1,91 mg/g de pétalas, respectivamente.

### 2.23. *Rosa foetida* e outras variedades

Eugster e Märki-Fischer (1991) compilaram dados sobre os pigmentos encontrados nas flores e frutos de variedades antigas e recentes de rosas. A maioria dos dados sobre a composição de carotenóides em pétalas de rosas foi obtida por estes ou por um destes autores. Por exemplo, Buchecker e Eugster (1977), usando a técnica de cromatografia de adsorção clássica, identificaram sete carotenóides nas rosas amarelas de *Rosa foetida*. Märki-Fischer et al (1984), analisando as pétalas desta mesma flor através de métodos mais sofisticados, identificaram quase 40 componentes (Tabela 1). Do total destes componentes, cerca de 87% correspondiam a epoxicarotenóides. Neste mesmo trabalho foram elucidadas as estruturas absolutas de quatro auroxantinas ((8*R*,8'*S*), (8*S*,8'*S*), (8*R*,8'*R*) e (9'*Z*,8*R*,8'*R*)), quatro luteoxantinas ((8'*R*), (8'*S*), (9*Z*,8'*R*) e (9*Z*,8'*S*)) e de quatro novos carotenóides muito polares que possuíam um grupo β-terminal (3*S*,5*R*,6*R*)-triidroxilado (latoxantina, (9'*Z*)-latoxantina, (8'*S*)-latocrome e (8'*R*)-latocrome). Em trabalhos posteriores de Märki-Fischer e Eugster (1987a, 1987b, 1988a, 1988b, 1990), foram isolados novos carotenóides em diferentes espécies e variedades de rosas. O 10'-apo-β-carotenol-10', o (3*R*)-10'-apo-β-carotenodiol-3,10', o 10'-apolicopenol-10', o 10'-apolicopenóico-10' e rosaflueno são alguns exemplos deles. A Figura 1 mostra as estruturas apresentadas por Eugster e Märki-Fischer (1991) para a maioria dos carotenóides isolados de diferentes variedades de rosas.

Devido à diversidade de carotenóides isolados nas diferentes espécies de rosas, a Figura 1 serve para ilustrar a maioria das estruturas dos carotenóides isolados nas diferentes flores ou partes florais citadas neste artigo.

### 2.24. *Sandersonia aurantiaca*

Lewis et al. (1998) investigaram os carotenóides de flores de *Sandersonia aurantiaca* desde seu botão ainda verde até a sua senescência. A principal mudança durante o desenvolvimento da flor foi à perda de clorofilas, β-caroteno e luteína e o aumento de

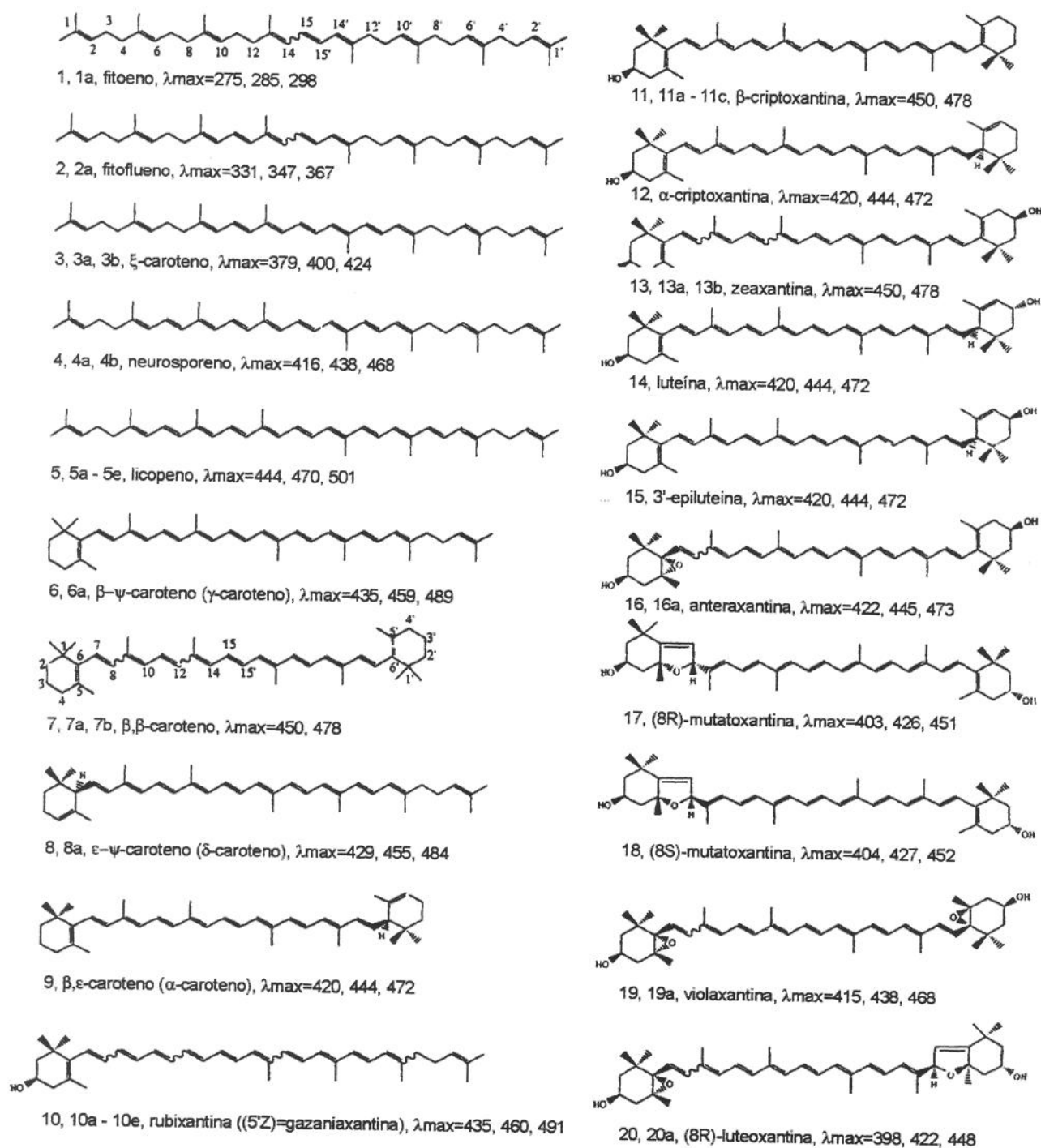


Figura 1: Estruturas e comprimentos de onda de máximos de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$  em nm, referentes à forma *trans*) dos carotenóides isolados de rosas. Os números das estruturas sem letras indicam os *E*-isômeros e os acompanhados com letras os *Z*-isômeros. A posição da ligação dupla *E* é indicada por uma linha ondulada na ligação simples precedente; ou seja, uma linha ondulada do C(14) ao C(15) indica a presença de uma ligação dupla (15Z, 15'Z).  
Fonte: Eugster e Märki-Fischer, 1991.

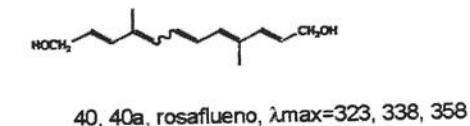
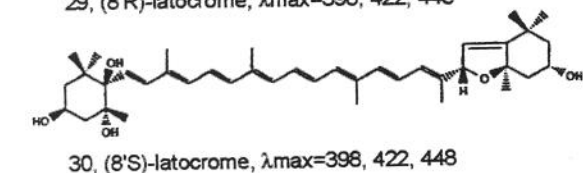
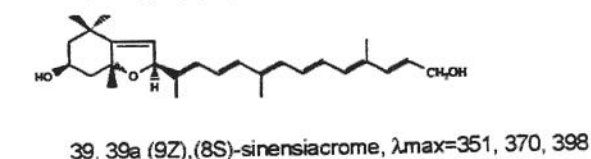
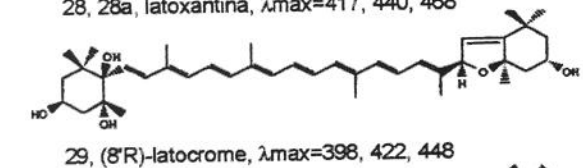
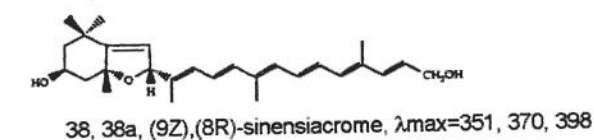
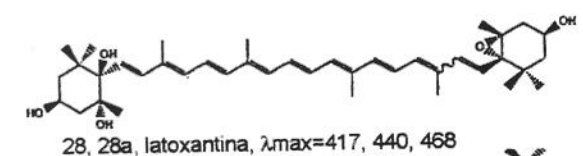
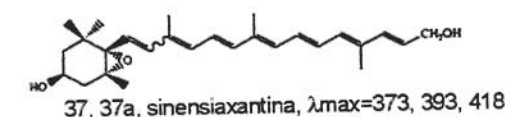
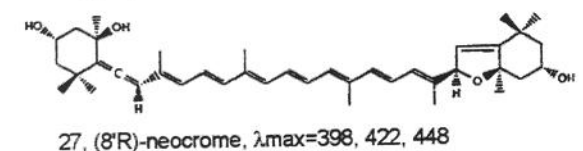
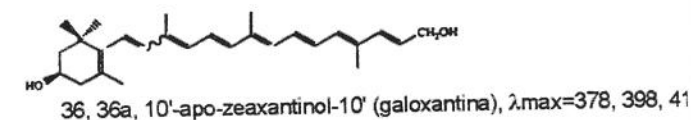
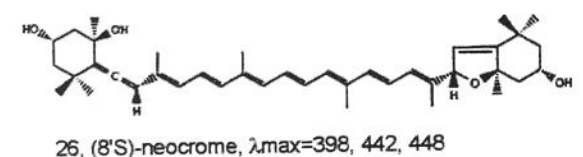
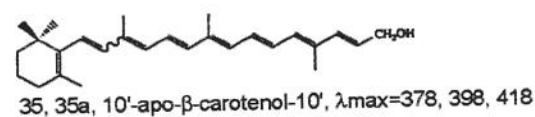
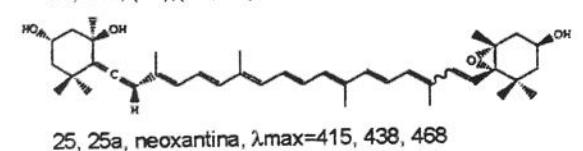
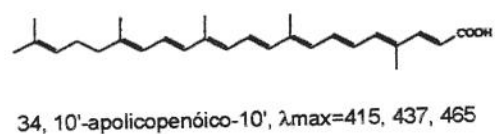
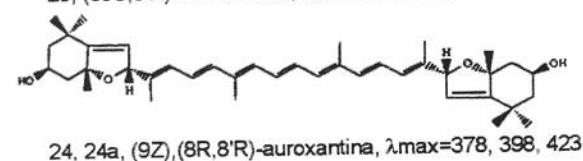
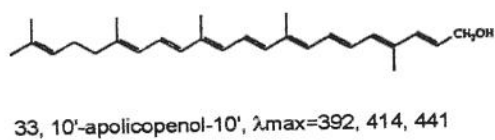
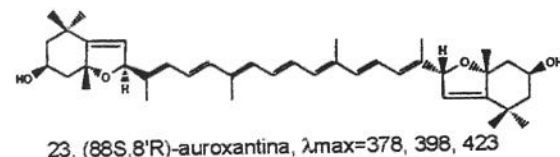
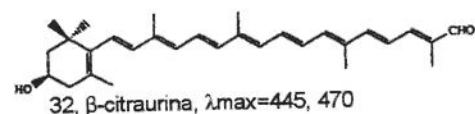
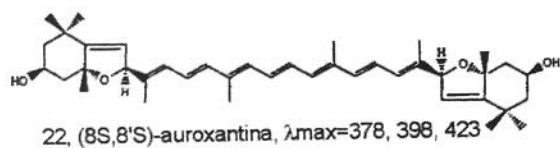
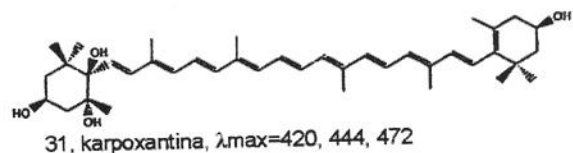
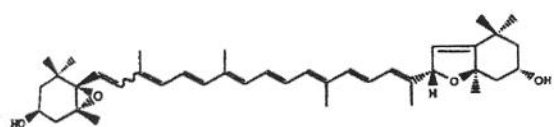


Figura 1: Continuação.

zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. Logo, a cor laranja das flores maduras foi atribuída principalmente a estes dois últimos, ambos presentes predominantemente na forma esterificada.

#### **2.25. *Tecoma stans***

O total de carotenóides nas pétalas frescas de *Tecoma stans* foi de 45,0 mg/g (Premachandra e colaboradores, 1974). Dentre os 14 carotenóides encontrados, os principais foram Z-violaxantina (47,2% do total de carotenóides), anteraxantina (32,1%) e criptoxantina (10,2%). Foi sugerido que as pétalas de *T. stans* poderiam ser usadas para melhorar a qualidade da cor da gema de ovos.

#### **2.26. *Thunbergia alata***

Entre outros parâmetros, Ljubescic et al. (1996) estudaram as variações de pigmentos nos cromoplastos das pétalas de flores de *Thunbergia alata* durante o seu desenvolvimento. Os pigmentos isolados dos botões verdes claros foram típicos de tecidos fotossintéticos, ou seja, clorofilas,  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Com o desenvolvimento da flor, as clorofilas desapareceram gradativamente e a concentração dos carotenóides aumentou rapidamente. Nas flores já maduras que exibiam coloração laranja, a concentração total de carotenóides atingiu 0,476 mg/g peso fresco, dos quais 87,5% era relativo a um caroteno não identificado, 4,6% a  $\beta$ -caroteno, 8% a luteína e o restante a traços de xantofilas.

#### **2.27. *Trollius europaeus***

Baumeler e Eugster (1992) sintetizaram (6*R*,todo-*E*)-neoxantina e comprovaram sua identidade comparando suas propriedades físicas com as da neoxantina isolada de flores de *Trollius europaeus*. Além de todo-*E*-neoxantina, o cromatograma do extrato de neoxantina extraída destas flores apresentou (8'*R*)- e (8'*S*)-neocromo e 9'*Z*-neoxantina.



### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente compilação de dados mostra a grande variedade de carotenóides em flores. Entretanto, as investigações citadas representam apenas uma pequena parte do universo das flores. Além de várias espécies não terem sido investigadas, muitas análises já realizadas não apresentam dados quantitativos e, em alguns casos, as composições qualitativas e quantitativas foram apenas parciais.

Adicionalmente às cores naturais das flores existentes, novas cores podem ser criadas, por exemplo através da combinação de diferentes tipos de pigmentos, manipulações genéticas e bloqueios de rotas biossintéticas. Mann et al. (2000), usando engenharia metabólica, conseguiram modificar o caminho biossintético de carotenóides nas flores de tabaco (*Nicotiana tabacum*), as quais passaram a produzir astaxantina. Os autores sugeriram que os procedimentos adotados podem servir de base para futuras manipulações genéticas de pigmentos em frutas e flores de importância comercial. Huang et al. (2001), aplicando a técnica de cruzamento e recruzamento nas flores de *Polianthes tuberosa* ‘Single’ e ‘Double’ e *Polianthes howardii*, obtiveram nove híbridos com flores de coloração rosa, roxa-avermelhada, roxa, laranja e amarela. Griesbach (1984), através de cruzamento de pétalas de *Phalaenopsis amboinenses* com *Doritaenopsis* Greber e seu híbrido, conseguiu produzir flores de coloração não encontrada nestas espécies. A nova cor resultou da combinação de carotenóides dourados com antocianinas magentas.

Assim, além dos avanços biotecnológicos possibilitarem o aparecimento de flores com cores novas, e conseqüentemente ampliarem a diversidade de pigmentos nas mesmas, outro aspecto valioso é a possibilidade de direcionar a biossíntese para a formação de carotenóides importantes à saúde humana.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abou-El-Maati, S.M.; Abd-Ellatif, E. (1992). Studies on carotenoid pigments isolated from petals of *Calendula officinalis* as food colouring agents. [Food Science Symposium], University of Alexandria, Egypt, p. 140-149.
- 2- Alam, A.U.; Couh, J.R.; Creger, C.R. (1968a). The carotenoids of the marigold, *Tagetes erecta*. Can. J. Bot. 46: 1539-1541.
- 3- Alam, A.U.; Couh, J.R.; Creger, C.R. (1968b). Fatty acid composition of the xanthophyll esters of *Tagetes erecta* petals. Lipids 3: 183-184.
- 4- Alam, A.U.; Creger, C.R.; Couh, J.R. (1968c). Petals of aztec marigold, *Tagetes erecta*, as a source of pigment for avian species. J. Food Sci. 33: 635-636.
- 5- AOAC. (1984). Official methods of analysis. 14<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D C.
- 6- Bartley, G.E.; Scolnik, P.A. (1995). Plant carotenoids: pigment for photoprotection, visual attraction, and human health. Plant Cell 7: 1027-1038.
- 7- Baumeler, A.; Eugster, C.H. (1992). Synthese von (6R,all-E)-neoxantina und verwandten allen-carotenoiden. Helv. Chim. Acta 75: 773-790.
- 8- Berset, D.; Pfander, H. (1985). Untersuchungen zur carotinoidzusammensetzung in blüten der gartenhybride *Narcissus* cvv "Golden Harvest". Helv. Chim. Acta 68: 1149-1154.
- 9- Bowen, P.E.; Hussain, E.; Stacewics-Sapuntzakis, M.; Damayanti, B.; Burns, J. (1997). Evaluation of bioavailability of lutein and lutein diesters in humans. FASEB J. 11: 2587.
- 10- Buchecker, R.; Eugster, C.H. (1977). Carotenoids in petals of *Rosa foetida*. Helv. Chim. Acta 60:1754-1757.
- 11- Carroll, M.; Hanlon, A.; Hanlon, T.; Zangerl, A.R.; Berenbaum, M.R. (1997). Behavioral effects of carotenoid sequestration by the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. J. Chem. Ecol. 23: 2707-2719.
- 12- Chew, B.P.; Wong, M.W.; Wong, T.S. (1996). Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. Anticancer Res.16: 3689-3694.
- 13- Debrunner, B.; Pfander, H. (1991). Isolierung und charakterisierung der hauptcarotinoide aus blütenblättern von *Brassica napus*. Chimia 45: 27-29.
- 14- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. (1996). Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-*trans*-lutein content in marigold flowers. J. Sci. Food Agric. 72: 283-290.
- 15- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. (1997a). Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. J. Agric. Food Chem. 45: 1097-1102.
- 16- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. (1997b). Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagete erecta*). Food Chem. 58: 255-258.
- 17- Deli, J.; Molnár, P.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A.; Pfander, H. (1998). Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-carotenoids from petals of *Lilium trigrinum*. Chromatographia 48: 27-31.
- 18- EDCC (Eye Disease Case-Control) Study Group. (1993). Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. Arch. Ophthalmol. 111: 104-109.
- 19- El-Hashmy, F.S.A.; Badie, A.Z.M.; Megahed, M.Y. (1986). Isolation and purification of  $\beta$ -carotene from fresh and dried calendula flowers. Minia J. Agric. Res. Dev. (Egypt) 8: 225-240.
- 20- Emter, O.; Falk, H.; Sitte, P. (1990). Specific carotenoids and proteins as prerequisites for chromoplast tubule formation. Protoplasma 157: 128-135.

- 21- Eugster, C.H.; Märki-Fischer, E. (1991). The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 654-672.
- 22- Foote, C.S.; Chang, Y.C.; Denny, R.W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. 10. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92: 5216-5218.
- 23- Gau, W.; Ploschke, H.J.; Wünsche, C. (1983). Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid ester from marigold flowers (*Tagete erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution. *J. Chromatogr.* 262 :277-284.
- 24- Gobatto-Rodrigues, A; Stort, M.N.S. (1992). Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) MIERS (Bignoniaceae). *Rev. Bras. Bot.* 15, 37-41.
- 25- Goodwin, T.W. (1980). Carotenoids in higher plants. In *The biochemistry of carotenoids*, Goodwin, T.W. (ed.), Chapman and Hall, New York.
- 26- Griesbach, R.J. (1984). Effects of carotenoid-anthocyanin combinations on flower color. *J. Hered.* 75: 145-147.
- 27- Gregory, G.K.; Chen, T.S.; Philip, T. (1986). Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 51: 1093-1094.
- 28- Guenther, E.; Carlson, C.W.; Olson, O.E.; Kohler, G.O; Livingston, A.L. (1973). Pigmentation of egg yolks by xanthophylls from corn, marigold, alfalfa and synthetic sources. *Poultry. Sci.* 52: 1787-1798.
- 29- Gusman, A.B.; Gottsberger, G. (1996). Differences in floral morphology, floral nectar constituents, carotenoids, and flavonoids in petals of orange and yellow *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae) flowers. *Phyton (Horn, Austria)* 36:161-171.
- 30- Hadden, W.L.; Watkins, R.H.; Levy, L.W.; Regalado, E.; Rivadeneira, D.M.; van Breemen, R.B.; Schwartz, S.J. (1999). Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4189-4194.
- 31- Head, S.W. (1973). Carotenoid constituents of Pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *J. Agri. Food. Chem.* 21: 999-1001.
- 32- Head, S.W. (1966). Effect of a residue from decolourisation of pyrethrum extract on yolk colour. *Poultry. Sci.* 45: 1269.
- 33- Huang, K.L.; Miyajima, I.; Okubo, H.; Shen, T.M.; Huang, T.S. (2001). Flower colours and pigments in hybrid tuberose (Polianthes). *Sci. Hortic.* 88: 235-431.
- 34- Jain, K.L.; Dhingra, H.R. (1991). Physical and biochemical characteristics of *Parkinsonia aculata* L. and *Pongamia pinnata* Vent. flowers. *J. Apicult. Res.* 30: 146-150.
- 35- Jungalwala, F.B., Cama, H.R. (1962). Carotenoids in *Delonix regia* (Gul Mohar) flowers. *Biochem. J.* 85: 1-8.
- 36- Kamata, T. (1986). Study of astaxanthin diester in the flower *Adonis aestivalis* and its application for the pigmentation of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Diss. Abstr. Int. B Sci. Eng.* 47: 449 Order no. DA8609885.
- 37- Kamata, T.; Neamtu, G.; Tanaka, Y.; Sameshima, M.; Simpson, K.L. (1990a). Utilization of *Adonis aestivalis* as a dietary pigment source for rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 56: 783-788.
- 38- Kamata, T.; Tanaka, Y.; Yamada, S.; Simpson, K.L. (1990b). Study of carotenoid composition and fatty acids of astaxanthin diester in rainbow trout *Salmo gairdneri* fed the *Adonis* extract. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 56: 789-794.
- 39- Khachik, F.; Steck, A.; Pfander, H. (1999). Isolation and structural elucidation of (13Z, 13'Z, 3R,3'R,6'R)-lutein from marigold flowers, kale, and human plasma. *J. Agric. Food Chem.* 47: 455-461.

- 40- Kull, D.; Pfander H. (1995a). Appendix: List of new carotenoids. In Carotenoids Vol. 1A: isolation and analysis, Britton, G.; Liien-Jensen, S.; pfander, H. (eds.), Birkhäuser verlag, Basel, pp.295-317.
- 41- Kull, D.; Pfander H. (1995b). Isolation and identification of carotenoids from the petals of rape (*Brassica napus*). J. Agric. Food Chem. 43: 2854-2857.
- 42- Kull, D.; Pfander H. (1997). Isolation and structure of two (Z)-isomers of lutein from the petals of rape (*Brassica napus*). J. Agric. Food Chem. 45: 4201-4203.
- 43- Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Joa, H.; Kilbum, M.D.; Moore, L.L.; Sprague, K.E. (1997). A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. Exp. Eye Res. 65: 57-62.
- 44- Lewis, D. H.; Bloor, S.J.; Schwinn, K.E. (1998). Flavonoid and carotenoid pigments in flower tissues of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.). Sci. Hortic. 72: 179-192.
- 45- Ljubesic, N.; Wrisher, M.; Devidé, Z. (1996). Chromoplast structures in *Thunbergia* flowers. Protoplasma 193: 174-180.
- 46- Lützow, M.; Haaf, F.; Englert, G.; Beyer, P.; Kleinig, H. (1996). NADPH protoporphyrin IX dependent conversion of violaxanthin to a retro-carotenoid in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts in vitro. Phytochemistry 41: 729-734.
- 47- Mann, V.; Harker, M.; Pecher, I.; Hirschberg, J. (2000). Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nat. Biotechnol. 18: 888-892.
- 48- Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Takeda, S.; Takaragaki, S.; Ida, K. (2000). A new retro-carotenoid from the petals of the Californian yellow poppy *Eschscholtzia californica*. J. Nat. Prod. 63: 1288-1289.
- 49- Märki-Fischer, E.; Buchecker, R.; Eugster, C.H. (1984). Eine neuuntersuchung der carotinoide aus *Rosa foetida*: struktur von 12 neuen carotinoiden; stereoisomere luteoxanthine, auroxanthine, latoxanthine und latochrome. Helv. Chim. Acta 67: 2143-2154.
- 50- Märki-Fischer, E.; Eugster, C.H. (1985). Das carotinoidspektrum der antheren und petalen von *Lilium trigrinum* cv. 'Red Night'. Helv. Chim. Acta 68: 1708-1715.
- 51- Märki-Fischer, E.; Eugster, C.H. (1987a). Dyes from roses. 5. Isolation of 10'-ol- and (3R)-10'-apo-beta-carotene-3,10'-diol (Galloxanthin) from rose flowers. Helv. Chim. Acta 70: 1988-1993.
- 52- Märki-Fischer, E.; Uebelhart, P.; Eugster, C.H. (1987b). Dyes from roses. 6. 10'-apolycopene-10'-ol and 10'-apolycopene-10'-oic acid from the petals of the rose hybrid Marechal Niel. Helv. Chim. Acta 70: 1994-2002.
- 53- Märki-Fischer, E.; Eugster, C.H. (1988a). Stereoisomeric sinensiaxanthins and sinensiachromes - separation and absolute-configuration. 7. Helv. Chim. Acta 71: 24-30.
- 54- Märki-Fischer, E.; Eugster, C.H. (1988b). Rosafluine, a novel diapocarotenediol from rose petals. Helv. Chim. Acta 71: 1491-1497.
- 55- Märki-Fischer, E.; Eugster, C.H. (1990). A further now successful search for 3'-epilutein in plants. Helv. Chim. Acta 73: 1206-1209.
- 56- Markham, K.R.; Hammett, K.R.W. (1994). The basis of yellow coloration in *Lathyrus aphaca* flowers. Phytochemistry 37: 163-165.
- 57- Mcgeachin, R.B.; Bailey, C.A. (1995). Determination of carotenoid pigments, retinol, and  $\alpha$ -tocopherol in feeds, tissues, and blood serum by normal phase high-performance liquid chromatography. Poultry. Sci. 74: 407-411.
- 58- Mejía, E.G.; Loarca-Pina, G.; Ramos-Gómez, M. (1997). Antimutagenicity of xanthophylls in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. Mutation Res. 389: 219-226.



- 59- Mendieta, R.M.; Del-Amos, S.R. (1981). Plantas medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, CECSA, Yucatán, Mexico, p 330.
- 60- Minguez-Mosquera, M.I.; Hornero-Mendez, D. (1994). Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. J. Agric. Food Chem. 42: 640-644.
- 61- Mitchell, K.A.; Markham, K.R.; Boase, M.R. (1998). Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. Phytochemistry 47: 355-361.
- 62- Neher, R.M. (1968). The ethnobotany of *Tagetes*. Econ. Bot. 22: 317-324.
- 63- Nielsen, K.M.; Bloor, S.J. (1997). Analysis and developmental profile of carotenoid pigments in petals of three yellow petunia cultivars. Sci. Hortic. 71: 257-266.
- 64- Palmer L.S. (1915). Xanthophyll, the principal nature yellow pigment of egg yolk, body fat and blood serum of the hen. The physiological relation of pigment to the xanthophylls of plant. J. Biol. Chem. 23: 261.
- 65- Park, J.S.; Chew, B.P.; Wong, T.S. (1997). Effect of dietary of lutein on growth of mammary tumor in BALB/c mice. FASEB J. 11: 2586.
- 66- Partali, V.; Liaaen-Jensen, S.; Huneck, S.; Khaidav, T. (1987). Carotenoids from the flowers of *Lilium pumilum*. Pharmazie 42: 208.
- 67- Plebluda, H.J.; Wertz, P.F.; Hoffman, W.H. (1966). French Patent 1,434,955. Chem. Abstr. 65-19233c.
- 68- Pfander, H. (1987). Key to carotenoids, 2<sup>nd</sup> ed., Pfander, H. (ed.), Birkhäuser, Basel.
- 69- Philip, T.; Berry, J.W. (1975). Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers. J. Food Sci. 40: 1089-1090.
- 70- Philip, T.; Weber, C.W.; Berry, J.W. (1976a). Utilization of lutein and lutein-fatty acid esters by laying hens. J. Food Sci. 41: 23-25.
- 71- Philip, T.; Weber, C.W.; Berry, J.W. (1976b). Process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals. J. Food Sci. 41: 163-164.
- 72- Pöhm, M. (1983). Die carotinoide der kronblätter von *Primula veris* L. Sci. Pharm. 51: 340-341.
- 73- Premachandra, B.R.; John, J.; Cama, H.R. (1974). Carotenoids in the flower petals of *Tecoma stans*. Indian J. Nutr. Diet. 11: 28-32.
- 74- Premachandra, B.R.; Vasantharajan, V.N.; Cama, H.R. (1978). Carotenoids in fruits and flowers. Wld. Rev. Nutr. Diet. 31: 154-158.
- 75- Quackenbush, F.W.; Miller, S.L. (1972). Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 55: 617-621.
- 76- Rivas, J.D.L. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. J. Chromatogr. 464: 442-447.
- 77- Rodriguez-Amaya, D.B. (1993a). Carotenoids: properties and analysis. In Encyclopaedia of Food Science and Nutrition, Vol. 1, Macrae, R.; Robinson, R.K.; Sadler, M. (eds.), Academic Press, London, p. 707-713.
- 78- Rodriguez-Amaya, D.B. (1993b). Nature and distribution of carotenoids in foods. In Shelf-life Studies of Foods and Beverages. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects, Charalambous, G. (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 547-589.
- 79- Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. J. Am. Med. Assoc. 272: 1413-1420.

- 80- Schersl, A. M. (1995). Supercritical extraction of astaxanthin from flowers of *Phaffia rhodozyma* or *Haematococcus pluvialis*, by supercritical fluid extraction. Patent RD 377032.
- 81- Simpson, K.L.; Chichester, C.O. (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 1: 351-374.
- 82- Subbarantnam, A.V.; Parsameswaran Pillay, P. (1947). *J. Sci. Ind. Res., Índia, Sect. B6*, 100.
- 83- Szabo, L.G.; Papp, E. (1975). Therapeutic use of some *Tagetes* species, their botanical, chemical, pharmacodynamic and agronomical characteristic. *Gyogyszereszet* 19: 281-285.
- 84- Tai, C.Y.; Chen, B.H. (2000). Analysis and stability of carotenoids in the flowers of daylily (*Hemerocallis disticha*) as affected by various treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5962-5968.
- 85- Thammasiri, K.; Yamamoto, H.Y.; Tang, C.S. (1984) Carotenoids and chlorophylls of yellow *Dendrobium* (Orchidaceae). *HortScience* 19: 596.
- 86- Thakur, B.R.; Arya, S.S. (1989). Stability of Gul Mohar (*Delonix regia*) carotenoids in isolated model systems. *J. Food Sci. Technol. India* 26: 76-78.
- 87- Tosco, U. (1970). *Diccionario de Botánica*. Instituto Geográfico de Agostini, Teide, Barcelona, Spain, p 235.
- 88- Tóth, Gy.; Szabolcs, J. (1970). Distribution of carotenoids in flowers of *Helianthus annuus*, *Impatiens noli tangere*, *Ranunculus acer*, *Taraxacum officinale*, and in ripe hips of *Rosa canina* e *Rosa rubiginosa*. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 64: 393-406.
- 89- Valadon, L.R.G.; Mummery, R.S. (1967). Carotenoids of certain compositae flowers. *Phytochemistry* 6: 983-988.
- 90- Valadon, L.R.G.; Mummery, R.S. (1968). Carotenoids in floral parts of a narcissus, a daffodil and a tulip. *Biochem. J.* 106: 479-484.
- 91- Valdés, H.L.; García, R.P. (1999). *Calendula officinalis*. *Rev. Cubana Farm.* 33: 188-194.
- 92- Vasudevan, P.; Kashyap, S.; Sharma, S. (1997). *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technol.* 62: 29-35.
- 93- Zonta, F.; Stancher, B.; Marletta, G.P. (1987). Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of free carotenoids and carotenoid esters. *J. Chromatogr.* 403: 207-215.
- 94- Wild, R.; Dobrovolny, H. (1976). Detection of marigold flower (*Tagetes*) extracts in orange products by high pressure liquid chromatography. *Brauwissenschaft* 29: 93-100.

## **CAPÍTULO 2**

### **PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE MICROALGAS**



# PRODUCTION AND APLICATION OF CAROTENOIDS FROM MICROALGAE

Marise C. de Mello and Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas – C. P.: 6121- CEP: 13083-970 - Campinas – SP-Brasil.

**ABSTRACT-** Microalgae biosynthesize a range of carotenoids and many of them present complex carotenoid composition. Depending on the species, strains, cultivation conditions or the use of new biotechnologies, this composition can vary and can even be directed to the production of specific carotenoids. At present  $\beta$ -carotene and astaxanthin are produced commercially by means of the microalgae *Dunaliella salina* (or *bardawil*) and *Haematococcus pluvialis*, respectively. Various studies have been indicating other microalgae as potential sources of these and other carotenoids. The production of carotenoids through microalgae and their applications are discussed.

## PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE CAROTENÓIDES DE MICROALGAS

**RESUMO-** As microalgas biossintetizam uma gama de carotenóides e muitas delas apresentam composição carotenóidica complexa. Dependendo das espécies, linhagens, condições de cultivos ou do emprego de novas biotecnologias, esta composição pode variar ou até mesmo ser direcionada para a produção de carotenóides específicos. Atualmente,  $\beta$ -caroteno e astaxantina são produzidos comercialmente a partir das microalgas *Dunaliella salina* (ou *bardawil*) e *Haematococcus pluvialis*, respectivamente. Várias pesquisas vêm indicando outras microalgas como fontes potenciais destes ou de outros carotenóides. A produção de carotenóides através de microalgas e suas aplicações são discutidas.

## 1- Introdução

A biotecnologia de microalgas ganhou importância nos últimos anos devido ao desenvolvimento de novas tecnologias ambientais e de produção. O fato das microalgas necessitarem basicamente de substratos como luz solar e CO<sub>2</sub> para crescerem, faz com que sejam usadas como biocatalizadores baratos e efetivos para obtenção de compostos de alto valor agregado. Além disto, a própria biomassa formada durante o processo de produção pode ser usada como fonte de proteína (Vilchez et al., 1997). Os principais compostos comercializados são polissacarídeos, lipídeos, proteínas, carotenóides, pigmentos, vitaminas, esteróis, enzimas, antibióticos, fármacos, e outros químicos finos (ou seus precursores), bem como hidrogênio, hidrocarbonetos e outros biocombustíveis (Borowitzwa, 1992, 1993; Becker, 1994a, b).

Para que a produção de microalgas alcance critérios de sustentabilidade, uma série de condições e de requisitos de qualidade deve ser atingida (Gouveia et al., 1996). Devido ao grande volume de biomassa produzida, o custo da coleta deve ser baixo; seu aproveitamento, íntegro; e o meio de cultura, reciclado. O considerável risco de contaminação do meio deve ser reduzido ao mínimo, como, por exemplo, com a adaptação de sistemas fechados. A extração do composto desejado deve ser eficiente; o produto final, estável; e a produção, mantida ao longo do ano.

A biomassa de microalgas é utilizada também como alimento em aquacultura. Neste tipo de aplicação seu papel é de suprir nutrientes básicos, conferir a coloração desejada a peixes e crustáceos, ou desempenhar outras funções biológicas (Muller-Feuga, 2000).

A maioria dos produtores de microalgas encontra-se na região Pacífico-Asiática, onde há cultivos de *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Isochrysis* e *Chaetoceros*. A maior parte da biomassa produzida é comercializada como suplemento alimentar através de tabletes e cápsulas. Esta biomassa (ou os diferentes compostos extraídos da mesma) pode também ser adicionada a massas, vinhos, bebidas, cereais matinais e cosméticos (Lee, 1997).

A presente revisão restringe-se às microalgas que são fontes atuais e potenciais para produção comercial de carotenóides, em especial as microalgas *Dunaliella salina* (ou *bardawil*) e *Haematococcus pluvialis*. Entretanto, trabalhos extensivos sobre a elucidação das estruturas de carotenóides em algas, tanto macro como microalgas, têm sido realizados especialmente pelo grupo de Liaaen-Jensen (Aakermann et al., 1992, 1993; Englert et al., 1993, 1995; Egeland e Liaaen-Jensen, 1995; Egeland et al., 1995, 1997; Bjornland et al., 2000). Estes estudos têm

demonstrado a utilidade dos carotenóides como marcadores quimiosistemáticos em algas. A Figura 1 mostra algumas das estruturas de carotenóides isolados de algas.

A produção comercial de carotenóides através de microalgas concentra-se nas espécies *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, das quais são extraídos  $\beta$ -caroteno e astaxantina, respectivamente. No processo de cultivo comercial, estas algas verdes são submetidas a condições de estresse, tais como irradiação elevada e limitação de nutrientes, e passam a acumular grandes quantidades de carotenóides (Donkin, 1976; Czygan, 1968; Vechetel et al., 1992) em corpos lipídicos localizados fora dos cromoplastos (Vechetel et al., 1992). Os carotenóides produzidos nestas condições são conhecidos como carotenóides secundários. A maioria das algas verdes acumula principalmente 4(4')-cetocarotenóides, como por exemplo a alga *Haematococcus pluvialis* que produz astaxantina. Entretanto, algumas espécies, como a *Dunaliella salina*, acumulam  $\beta$ -caroteno.

A astaxantina e o  $\beta$ -caroteno tem sido usados em diversas aplicações como colorir ou enriquecer os alimentos ou como suplementos farmacêuticos para reduzir o risco de várias doenças em humanos. Na indústria de cosméticos, estes pigmentos são acrescentados a diferentes produtos indicados para a nutrição, coloração ou proteção da pele. Em aquacultura e avicultura, são utilizados para fins nutricionais e como agente de pigmentação.

Além de astaxantina e  $\beta$ -caroteno, vários outros tipos de carotenóides são biossintetizados por diferentes microalgas. O aproveitamento desta capacidade por novas biotecnologia, como por exemplo a engenharia genética, pode incrementar e diversificar a produção comercial de carotenóides através de microalgas.

## **2- Produção de $\beta$ -Caroteno Através da Microalga *Dunaliella Salina***

A *Dunaliella salina* é o eucarionte mais halofílico conhecido e que cresce satisfatoriamente em meio com salinidade superior a 22% p/v de NaCl (7 a 8 vezes maior que a da água do mar). Esta microalga é capaz de resistir a concentrações acima de 30% de NaCl e altas temperaturas (Borowitska, 1993), o que favorece seu cultivo em sistemas abertos, os quais demandam um menor investimento na construção e manutenção.

A *Dunaliella* é considerada a maior fonte natural de  $\beta$ -caroteno chegando a conter mais do que 10% deste pigmento em relação ao seu peso seco. O  $\beta$ -caroteno é composto principalmente dos isômeros 9-*cis* e todo-*trans*. As condições empregadas durante o cultivo que proporcionam o

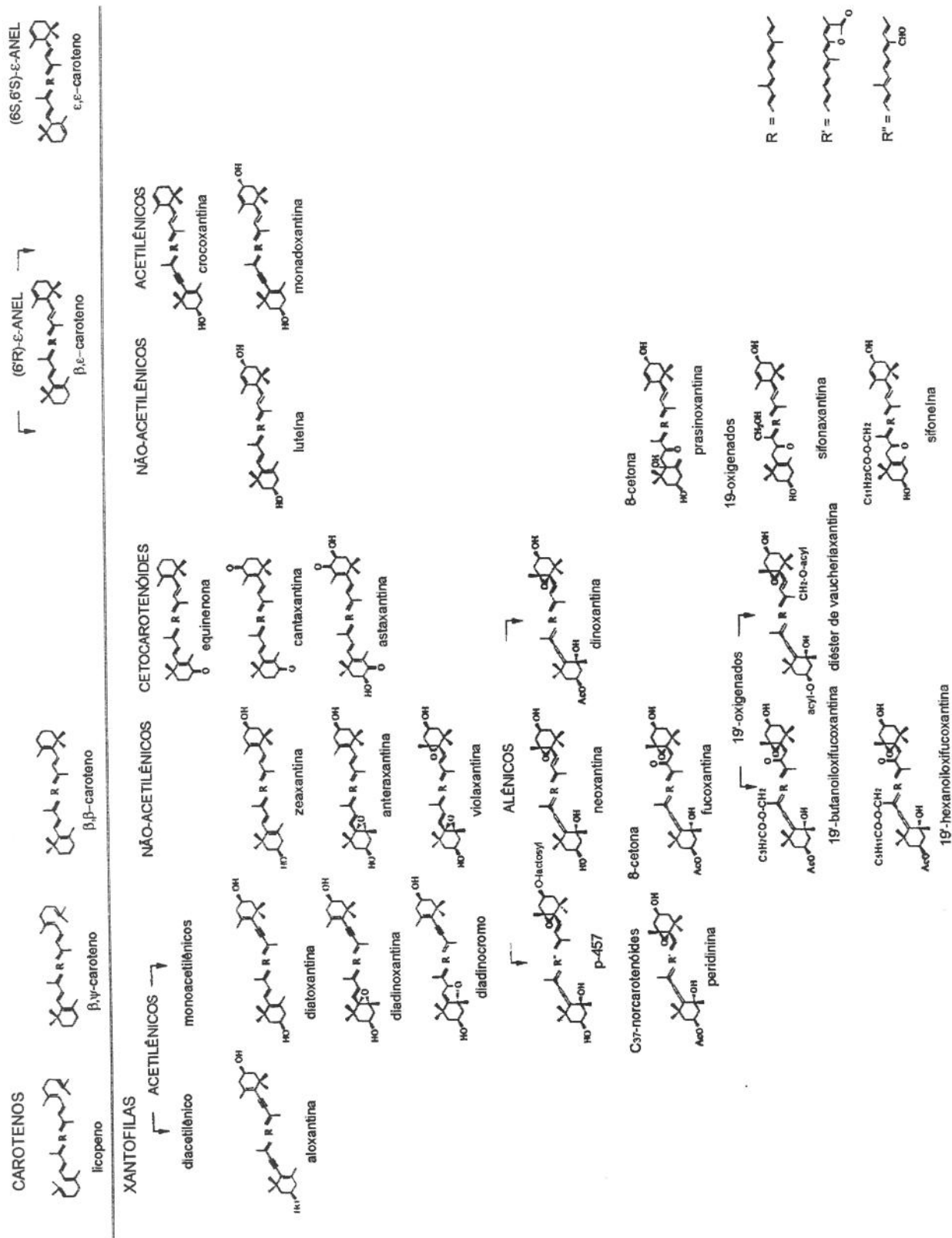


Figura 1. Estruturas dos carotenóides encontrados em algas.  
Fonte: Bjørnland, 1997.

marcante acréscimo na produção de  $\beta$ -caroteno são intensidade luminosa alta e deficiência de nitrogênio (Ben-Amotz et al., 1982; Loeblich, 1982).

O sucesso da exploração comercial de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina* exigiu um aumento da taxa de crescimento e do conteúdo do pigmento nas células. Essas metas foram alcançadas através de um maior conhecimento sobre a fisiologia da microalga e da utilização de linhagens cada vez melhores, obtidas através de seleção, mutagêneses ou engenharia genética. Uma das etapas do processo de produção que ainda necessita de aprimoramento é a separação das células do meio de cultura, que apresentam densidades próximas (Borowitzka, 1993).

A produção de  $\beta$ -caroteno através da microalga *Dunaliella* é feita por algumas empresas como a Algatec (EUA), Western Biotechnology Ltd (Austrália), Betatene Ltd (Austrália), Microbio Resources Ltd (EUA) e a NatureBeta (Israel). O  $\beta$ -caroteno produzido é comercializado na forma de extrato, suspensão em óleo vegetal ou na forma de pó da microalga. Nos alimentos estes produtos são usados para colorir e enriquecê-los, enquanto que nos produtos farmacêuticos e cosméticos suas características antioxidativas e nutricionais são enfatizadas e relacionadas à saúde. Já em aquacultura sua função é nutrir e acentuar a coloração de peixes e crustáceos (Borowitzka, 1993).

O maior concorrente do  $\beta$ -caroteno produzido a partir de *Dunaliella* é o *trans*- $\beta$ -caroteno sintético, cujo custo de produção é menor. Entretanto, o primeiro tem a vantagem de ser um produto natural e sugeriu-se que o mesmo é biologicamente mais ativo, possivelmente por conter, na proporção de 2:1, os isômeros 9-*cis*- e *all-trans*- $\beta$ -caroteno (Ben-Amotz et al., 1989; Ben-Amotz e Avron, 1989).

### **3- Produção de Astaxantina Através da Microalga *Haematococcus pluvialis***

A microalga *Haematococcus pluvialis* é considerada a melhor fonte natural para obtenção de astaxantina (Czygan, 1968; Donkin, 1976; Grung et al, 1992; Grunewald et al., 2001), sendo cultivada comercialmente pela companhia Microbio Resources (EUA). Esta microalga chega a conter acima de 4% de astaxantina em relação ao seu peso seco (Boussiba, 2000), valor maior que o encontrado em outras fontes como a farinha de crustáceos e a levedura *Phaffia rhodozyma* (Borowitzka, 1993). A microalga *H. pluvialis* acumula astaxantina quando cultivada sob condições de estresse, como por exemplo, deficiência de nitrogênio ou fósforo, alta salinidade ou exposição a luminosidade intensa (Boussiba e Vonshak, 1991; Kobayashi et al., 1993, 1997; Harker et al., 1996b; Fábregas et al., 1998; Boussiba et al., 1999). A astaxantina de *H. pluvialis*

apresenta isômeros (86% na forma *all-trans* e 14% *cis*) com configuração (3*S*,3'*S*). Este pigmento encontra-se predominantemente na forma esterificada, onde 70 a 80% são monoésteres e o restante é formado por diésteres (Renstrom et al., 1981; Kobayashi et al., 1991; Grung et al., 1992).

A viabilização do cultivo da microalga *H. pluvialis* necessitou de vários aprimoramentos (Bubrick, 1991; Kobayashi et al., 1992; Fan et al., 1994; Harker et al., 1995, 1996a; Moya et al., 1997; Olaizola, 2000; Grunewald e Hagen, 2000; Mendes-Pinto et al., 2001; Orosa et al., 2001a). Por crescer em água doce, onde o grau de suscetibilidade a contaminação é elevado, foi necessário desenvolver sistemas de cultivo fechado. Foram ainda selecionadas linhagens com um conteúdo maior de astaxantina e mais resistentes a temperaturas elevadas do que a estirpe selvagem, a qual cresce preferencialmente entre 15 e 20°C (Borowitzka, 1993).

A astaxantina produzida é usada como fonte de pigmento nas dietas de peixes e animais (Benemann, 1992), mas também apresenta possíveis aplicações clínicas devido a sua alta atividade antioxidativa (Miki, 1991; Krinsky, 1993). Por exemplo, a astaxantina mostrou capacidade antioxidativa maior que a do  $\beta$ -caroteno e a da zeaxantina em um sistema de radicais livres *in vitro* (Terão, 1989).

Assim como o  $\beta$ -caroteno sintético, a astaxantina sintética também apresenta um custo menor de produção. Entretanto, o mercado para produção de astaxantina natural tende a crescer devido à preferência crescente do consumidor por produtos naturais.

#### **4- Carotenóides Secundários de Outras Espécies de Algas Verdes**

O potencial da produção carotenóides secundários, principalmente de cetocarotenóides, por outras espécies de microalgas tem sido alvo de vários investigadores. Grung et al. (1989) observaram que duas linhagens de *Botryococcus braunii* sintetizavam equinenona (20 e 28% do total de carotenóides) e cantaxantina (46% do total) durante a fase estacionária de crescimento. Observou-se que apenas *Chlorella fusca* (*pyrenoidosa*) divide com *Botryococcus braunii* a propriedade de produzir equinenona e cantaxantina como os principais carotenóides secundários. Uma outra microalga que sintetiza vários tipos e carotenóides secundários quando cultivada sob deficiência de nitrogênio, a *Eremosphaera viridis*, sintetizou seis ésteres de astaxantina, cantaxantina, equinenona e um éster de luteína (Vechtel et al., 1991, 1992).

As microalgas *Neochloris wimmeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Chlorella zofingiensis* e *Protosiphon botryoides* foram cultivadas sob deficiência de nitrogênio e



elevada luminosidade e passaram a produzir quantidades significativas de éster de astaxantina e cantaxantina (Orosa et al., 2000). Estas espécies apresentaram alta resistência as condições ambientais, uma qualidade importante para a viabilização do cultivo em tanques abertos. No entanto, a concentração e conteúdo total de astaxantina nestas microalgas foram menores que os encontrados em *H. pluvialis* (Orosa et al., 2001b).

*Chlorococccum* sp acumula vários carotenóides secundários, como astaxantina, ésteres de astaxantina e outros carotenóides, chegando a totalizar 5,2 mg/g de peso seco. Esta microalga apresenta tolerância a temperaturas altas e a valores extremos de pH, taxa alta de crescimento e facilidade de cultivo em sistemas abertos. Estas qualidades tornam a *Chlorococccum* sp uma fonte promissora para a produção comercial de carotenóides secundários, particularmente de astaxantina (Zhang e Lee, 1997, 1999). Liu e Lee (1999) estudaram a composição de carotenóides secundários desta microalga e encontraram um total de oito carotenóides, sendo os principais cantaxantina (32% do total de carotenóides secundários), 3'-hidroxiequinenona (23%), adonirubina (12%), astaxantina (10%) e adonixantina (9%).

A microalga *Chlorella emersonii* acumula principalmente cantaxantina quando cultivada sob irradiação de alta intensidade e deficiência de nitrogênio (Arad et al., 1993). Nestas mesmas condições os carotenóides secundários acumulados pela microalga *Chlorella zofingiensis* eram formados por cerca de 30% de cantaxantina e 70% de astaxantina, ambos na forma de mono e diésteres (Rise et al., 1994; Bar et al., 1995). A microalga *Chlorella vulgaris* produz principalmente cantaxantina e astaxantina quando cultivada em condições de alta salinidade, intensa irradiação ou deficiência de nutrientes (Novais et al., 1993).

A cantaxantina é empregada como pigmento em rações para colorir peixes, como salmão e truta, gema de ovos e também tem sido usada na indústria de alimentos (Johnson e Hwan, 1991). Porém, o uso de cantaxantina foi restringido após estudos terem demonstrado que uma alta ingestão deste pigmento, por um período longo, pode levar a deposição de cristais de cantaxantina na retina (Kopcke et al., 1995). A dosagem mínima para formação destes cristais foi de 30 mg/dia.

Uma discussão detalhada de vários aspectos da produção de cetocarotenóides a partir de microalgas pode ser encontrada nos trabalhos de Margalith (1999) e Krishna e Mohanty (1998).

## 5- Considerações Finais

A aplicação de métodos clássicos de melhoramento de linhagens e de novas biotecnologias a cultivo de microalgas pode viabilizar a biossíntese comercial de diversos tipos de outros carotenóides altamente valorizados, como luteína, zeaxantina e licopeno (Ausich, 1997). Estes pigmentos possuem propriedades antioxidativas, em especial o licopeno e a luteína (Khachik et al., 1995), o que indica suas aplicações nas áreas de saúde e cosmética. Outros carotenóides, como a fucoxantina e a peridinina, são biossintetizados em grandes quantidades por várias espécies de microalgas (Liaaen-Jensen, 1978). Porém, esses carotenóides são muito oxidados, propriedade que reduz suas possíveis aplicações como corante em alimentos.

A luteína é empregada atualmente na pigmentação de gema de ovos, pele e músculo de aves e apresenta um papel importante, junto com a zeaxantina, na prevenção da degeneração macular (EDDC, 1993; Seddon et al., 1994; Landrum et al., 1999). Essa luteína é extraída a baixos custos de flores de *Tagetes erecta*, mas poderia ser também explorada de algumas espécies de microalgas da classe Chlorophyceae, onde é o carotenóide principal (Braumanne Grimme, 1979, 1981; Mantoura e Llewellyn, 1983; Wright e Shearer, 1984; Wright et al., 1991; Heukelem et al., 1994).

A zeaxantina é um dos principais carotenóides de algumas espécies da classe Cyanophyceae (Hertzberg et al., 1971; Wright et al., 1991), como por exemplo da *Synechococcus* sp. Quando essa microalga (estirpe PCC7942) foi cultivada sob condições de irradiação intensa, houve acúmulo deste pigmento nas suas células e membranas citoplasmáticas (Masamoto e Furukawa, 1997; Masamoto et al., 1999). A produção de zeaxantina a partir de microalgas de outras classes, como a alga verde *Neosporangiococcum excentricum*, também aumentou com o desenvolvimento de novas linhagens e o aprimoramento das condições de cultivo (Hassler et al., 1995).

O licopeno aparece geralmente como componente minoritário nas microalgas da classe Prasinophyceae e em traço nas da classe Cyanophyceae (Jeffrey et al., 1997). Uma das causas da baixa concentração deste pigmento nestas microalgas é a formação de  $\beta$ -caroteno pela ciclização enzimática do licopeno (Goodwin, 1971). O desenvolvimento de novos métodos que inibam a ação da enzima ciclizante (*lycopene cyclase*) pode resultar no acúmulo de licopeno.

A tendência para uso de produtos mais naturais associada ao aumento do número de aplicações de carotenóides em medicina, cosmética, alimentos e rações, promove o crescimento do mercado para produção dos mesmos através de métodos biológicos. Neste contexto as microalgas destacam-se pela diversidade de carotenóides que são capazes de biossintetizar.

## 6- Referências Bibliográficas

- Aakermann, T.; Skulberg, O.M.; Liaaen-Jensen, S. (1992). A comparison of the carotenoids of strain of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria). *Biochem. Syst. Ecol.*, 20: 761-769.
- Aakermann, T.; Guillard, R.R.L.; Liaaen-Jensen, S. (1993). Algal carotenoids. 55. Structure elucidation of (3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-13'-*cis*-7',8'-dihydroneoxanthin-20'- $\alpha$ 3'-beta-d-lactoside (P457). 1. Reisolation, derivatization and synthesis of model compounds. *Acta Chem. Scand.*, 47: 1207-1213.
- Arad, S.; Cohen, E.; Ben-Amotz, A. (1993). Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. *Physiol. Plant*, 87: 232-236.
- Ausich, R.L. (1997). Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure Appl. Chem.*, 69: 2169-2173.
- Bar, E.; Rise, M.; Vishkautsan, M. (1995). Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.*, 146: 527-534.
- Becker, E.W. (1994a). Introduction. In: *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Carey, N.H.; Higgins, I.J.; Potter, W.G. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 1-4.
- Becker, E.W. (1994b). Outlook. In: *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Carey, N.H.; Higgins, I.J.; Potter, W.G. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 276-279.
- Ben-Amotz, A.; Katz, A.; Avron, M. (1982). Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 18: 529-537.
- Ben-Amotz, A.; Avron, M. (1989). The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 25: 175-178.
- Ben-Amotz, A.; Mokady, S.; Avron, M. (1989). Bioavailability of a natural isomer mixture as compared with synthetic all-*trans*- $\beta$ -carotene in rats and chicks. *J. Nutr.*, 119: 1013-1019.
- Benemann, J.R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.*, 4: 233-245.
- Bjornland, T.; Fiksdahl, A.; Skjetne, T.; Krane, J.; Liaaen-Jensen, S. (2000). Gyroxanthin - the first allenic acetylenic carotenoid. *Tetrahedron*, 56: 9047-9056.
- Borowitzka, M.A. (1992). Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. *J. Appl. Phycol.*, 4: 267-279.
- Borowitzka, M.A. (1993). Product from microalgae. *Infofish Int.*, 5: 21-26.
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant*, 108: 111-117.

- Boussiba, S.; Bing, W.; Yuan, J.P.; Zarka, A.; Chen, F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.*, 21: 601-604.
- Boussiba, S.; Vonshak, A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.*, 32: 1077-1082.
- Braumann, T.; Grimme, L. (1979). Single-step separation of photosynthetic pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 170: 264-268
- Braumann, T.; Grimme, L. (1981). Reverse-phase high-performance liquid chromatography and chlorophylls and carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 637: 8-17.
- Bubrick, P. (1991). Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technol.*, 38: 237-239.
- Czygan, F.C. (1968). Sekundär-carotinoid in grünalgen Chemie, vorkommen und faktoren welche die bildung dieser polyne beeinflussen. *Arch. Mikrobiol.*, 61: 81-102.
- Donkin, P. (1976). Ketocarotenoid biosynthesis by *Hematococcus lacustris*. *Phytochemistry*, 15: 711-715.
- EDCC (Eye Disease Case-Control). (1993). Study Group. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.*, 111: 104-109.
- Egeland, E.S.; Liaaen-Jensen, S. (1995). Ten minor Carotenoids from Prasinophyceae (Chlorophyta). *Phytochemistry*, 40: 515-520.
- Egeland, E.S.; Eikrem, W.; Throndsen, J.; Wilhelm, C.; Zapata, M.; Liaaen-Jensen, S. (1995). Carotenoids from further Prasinophytes. *Biochem. Syst. Ecol.*, 23: 747-755.
- Egeland, E.S.; Guillard, R.R.L.; Liaaen-Jensen, S. (1997). Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in Prasinophyceae (Chlorophyta). *Phytochemistry*, 44: 1087-1097.
- Englert, G.; Aakermann, T.; Liaaen-Jensen, S. (1993). NMR-studies on natural all-trans-(9'Z,11'Z)-(3R,3'S,5'R,6'R)-pyrrhoxanthin, an acetylenic-C-37-skeletal nor-carotenoid butenolide. *Magn. Reson. Chem.*, 31: 910-915.
- Englert, G.; Aakermann, T.; Liaaen-Jensen, S. (1995). Algal carotenoids. 62. Structure elucidation of the algal carotenoid (3S,5R,6R,3'S,5'R,6'S)-13'-cis-7',8'-dihydroneoxanthin-20'-al3'-beta-lactoside (P457). 2.NMR studies. *J. Nat. Prod.*, 58: 1675-1682.
- Fan, L.; Vonshak, A.; Boussiba, S. (1994). Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus-pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 30: 829-833.
- Fábregas J.; Domínguez, A.; García-Álvarez, D.; Lamela, T.; Otero, A. (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, 20: 623-626.

- Gouveia, L.; Reis, A.; Velosos, V.; Empis, J.A. (1996a). Microalgal biomass as a sustainable alternative raw material. *Agro Food Ind. Hi-Tech.*, May-June: 29-34.
- Goodwin, T.W. (1971). In: *Aspects of Terpenoids Chemistry and Biochemistry*, Goodwin, T.W. (Ed.), Academic Press, New York, P. 315-356.
- Grunewald, K.; Hagen, C. (2000). Extrusion of secondary carotenoid containing vesicles from flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales; Chlorophyceae). *J. Appl. Bot. Angew Bot.*, 74: 141-144.
- Grunewald, K.; Hirschberg, J.; Hagen, C. (2001). Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biol. Chem.*, 276: 6023-6029.
- Grung, M.; Dsouza, F.M.L.; Borowitzka, M.; Liaaen-Jensen, S. (1992). Algal carotenoids. 51. Secondary carotenoids. 2. *Haematococcus-pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.*, 4: 165-171.
- Grung, M.; Metzger, P.; Liaaen-Jensen, S. (1989). Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 17: 263-269.
- Harker, M.; Tsavalos, A.J.; Young, A.J. (1995). Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.*, 7: 399-406.
- Harker, M.; Tsavalos, A.J.; Young, A.J. (1996a). Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 113-118.
- Harker, M.; Tsavalos, A.J.; Young, A.J. (1996b). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.*, 207-214.
- Hassler, R.A.; Heefner, D.L.; Liao, H.H.; Medwid, R.D.; Sniff, K.S.; Yarus, M.J. (1995). New *Neosporiococcus excentricum* algal strain - for production of xanthophyll colourants. US Patent 5437997.
- Hertzberg, S.; Liaaen-Jensen, S.; Siegelman, H.W. (1971). The carotenoids of blue green algae. *Phytochemistry*, 10: 3121-3127.
- Heukelem, L.V.; Lewitus, A.J.; Kana, T.M.; Craft, N.E. (1994). Improved separation of phytoplankton pigments using temperature-controlled high performance liquid chromatography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 114: 303-313.
- Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Bjornland, T. (1997). Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Wright, S.W. (Eds), UNESCO Publishing, Paris, pp. 449-559.



- Johnso, E.A.; Hwan An, G. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11: 297-326.
- Khachik, F.; Beecher, G.R.; Smith, J.C. (1995). Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J. Cell. Biochem.*, 22: 236-246.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Nagai, S. (1991). Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.*, 71: 335-339.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Yamaguchi, K.; Naomichi, N.; Nagai, S. (1992). Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 74: 17-20.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 867-873.
- Kobayashi, M.; Korimura, Y.; Tsuji, Y. (1997). Light independent astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.*, 19: 507-509.
- Kopcke, W.; Barker, F.M.; Schalch, W. (1995). Canthaxanthin deposition in the retina – A biostatistical evaluation of 411 patients. *J. Toxicol.: Cutaneous Ocul. Toxicol.*, 14: 89-104.
- Krinsky, N. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*, 13: 561-587.
- Krishna, K.B.; Mohanty, P. (1998). Secondary carotenoid production in green algae. *J. Sci. Ind. Res. India*, 57: 51-63.
- Landrum, J.T.; Bone, R. A.; Moore, L.L.; Gomez, C.M. (1999). Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas. *Methods. Enzymol.*, 299: 457-467.
- Lee, Y.K. (1997). Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.*, 9: 403-411.
- Liaaen-Jensen, S. (1978). Marine carotenoids. In: *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Scheuer, P.J. (Ed.), vol 2, chap. 1, Academic Press, New York, pp. 2-73.
- Liu, B.H.; Lee, Y.K. (1999). Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. *Biotechnol. Lett.*, 21: 1007-1010.
- Loeblich, L.A. (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in halophile *Dunaliella salina*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 62: 493-508.
- Mantoura, R.F.C.; Llewellyn, C.A. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 151: 297-314.



- Margalith, P.Z. (1999). Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 51: 431-438.
- Masamoto, K.; Furukawa, K. (1997). Accumulation of zeaxanthin in cells of the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 grown under high irradiance. *J. Plant Physiol.*, 151: 257-261.
- Masamoto, K.; Zsiros, O.; Gombos, Z. (1999). Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 grown under high light condition. *J. Plant Physiol.*, 155: 136-138.
- Mendes-Pinto, M.M.; Raposo, M.F.J.; Bowen, J. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.*, 13: 19-24.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63: 141-146.
- Moya, M.J.; Sánchez-Guardamino, M.L.; Vilavella, A.; Barberà, E. (1997). Growth of *Haematococcus lacustris*: A contribution to kinetic modelling. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68: 303-309.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.*, 12: 527-534.
- Novais, J.M.; Veloso, V.; Gouveia, L.; Reis, A.; Fernandes, H.M.; Empis, J.A. (1993). Carotenoids production from *Chlorella vulgaris*. In *Microalgae and health. 1st European Symposium*, Biocim, Montpellier, France, p. 23.
- Olaizola, M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.*, 12: 499-506.
- Orosa, M.; Torres, E.; Fidalgo, P.; Abalde, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *J. Appl. Phycol.*, 12: 553-556.
- Orosa, M.; Franqueira, D.; Cid, A.; Abalde, J. (2001a). Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnol. Lett.*, 23: 373-378.
- Orosa, M.; Valero, J.F.; Herrero, C.; Abalde, J. (2001b). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N starvation and high light conditions. *Biotechnol. Lett.*, 23: 1079-1085.
- Rise, M.; Cohn, E.; Vishkaustsan, M.; Cojocar, M.; Gottlieb, H.E.; Arad, S.M. (1994). Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J. Plant Physiol.*, 144: 287-292.
- Renstrom, B.; Borch, G.; Skulberg, O.M.; Liaaen-Jensen, S. (1981). Natural occurrence of enantiometric and meso-astaxanthin 3. Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry*, 20: 2561-2564.

- Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.*, 272: 1413-1420.
- Terão, J. (1989). Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24: 659-661.
- Vechtel, B.; Kahmann, U.; Ruppel, H.G. (1991). Secondary carotenoids in the cytoplasm of *Eremosphaera-viridis* De Bary (chlorophyceae, chlorococcales). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372: 543-544.
- Vechtel, B.; Kahmann, U.; Ruppel, H.G. (1992). Secondary carotenoids of *Eremosphaera-viridis* De Bary (Chlorophyceae) under nitrogen deficiency. *Bot. Acta*, 105: 219-222.
- Vilchez, C.; Garbayo, I.; Lobato, M.V.; Vega, J.M. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.*, 20: 562-572.
- Wright, S.W.; Shearer, J.D. (1984). Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Chromatogr.*, 294: 281-295.
- Wright, S.W.; Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Llewellyn, C.A.; Bjornland, T.; Repeta, D.; Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine-phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77: 183-196.
- Zhang, D.H.; Lee, Y.K.; Ng, M.L.; Phang, S.M. (1997). Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, 9: 147-155.
- Zhang, D.H.; Lee, Y.K. (1999). Ketocarotenoid production by a mutant of *Chlorococcum* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *Biotechnol. Lett.*, 21: 7-10.

## **CAPÍTULO 3**

### **CARACTERIZAÇÃO DAS FLORES DE *COSMOS SULPHUREUS* E *THELECHITONIA TRILOBATA* COMO FONTE DE LUTEÍNA**

# Characterization of *Cosmos sulphureus* and *Thelechitonina trilobata* Flowers as Sources of Lutein

Marise C. de Mello & Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de  
Campinas - C. P.: 6121- CEP: 13083-970 - Campinas - SP- Brasil

---

The concentration of lutein in yellow and orange *Cosmos sulphureus* and yellow *Thelechitonina trilobata* flowers was determined spectrophotometrically. This carotenoid was characterized by its absorption spectrum in the visible region, specific chemical reactions and behavior in thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The mean lutein content of yellow and orange *C. sulphureus* flowers was similar (ca. 670 µg/g fresh weight), but significantly lower than that of *T. trilobata* (820 µg/g). The two *C. sulphureus* flowers had identical HPLC carotenoid profile, which was slightly different from that of *T. trilobata*. The flowers investigated had almost exclusively lutein in the form of diesters. However, there were also traces of unidentified carotenoids, and small amounts of free lutein and a monohydroxycarotenoid, tentatively identified as α- and β-cryptoxanthin in *C. sulphureus* and *T. trilobata*, respectively. The lutein levels found in *C. sulphureus* and *T. trilobata* flowers are comparable or higher than those of *Tagetes erecta*, the main natural source of lutein, suggesting the possible utilization of these flowers as commercial sources of this carotenoid.

---

**Key Words:** *Cosmos sulphureus*; *Thelechitonina trilobata*; carotenoids; lutein; natural colorant

# Caracterização das Flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonía trilobata* como Fonte de Luteína

Marise C. de Mello & Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas – C. P.: 6121- CEP: 13083-970 - Campinas – SP- Brasil

---

O teor de luteína nas flores amarelas e laranjas de *Cosmos sulphureus* e flores amarelas de *Thelechitonía trilobata* foi determinado por espectrofotometria e sua caracterização feita através de seu espectro de absorção no visível, reações químicas específicas e comportamento em cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O teor médio de luteína nas flores amarelas e laranjas de *C. sulphureus* foi semelhante, em torno de 670 µg/g de peso fresco, mas significativamente menor que o valor encontrado em *T. trilobata* (820 µg/g). O perfil de carotenóides obtido por CLAE para as flores amarelas e laranjas de *C. sulphureus* foi também o mesmo e diferiu pouco do encontrado para *T. trilobata*. As flores investigadas continham quase que exclusivamente luteína na forma de diésteres. Entretanto, havia também traços de carotenóides não identificados, e pequenas quantidades de luteína livre e de um monoidroxilado, tentativamente identificado como α- e β-criptoxantina nas flores de *C. sulphureus* e *T. trilobata*, respectivamente. Os teores de luteína nas flores analisadas são comparáveis ou maiores que os encontrados nas flores de *Tagetes erecta*, a principal fonte natural de luteína, o que aponta para a possível utilização destas flores como fonte comercial deste carotenóide.

---

**Palavras Chaves:** *Cosmos sulphureus*; *Thelechitonía trilobata*; carotenóides; luteína; corante natural

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a única flor cultivada comercialmente como fonte de luteína é a de *Tagetes erecta*. Esta planta, originária do México (Tosco, 1970), apresenta flores de coloração amarela e laranja brilhante que têm sido amplamente estudadas e cujo uso está diretamente associado ao seu elevado conteúdo de luteína esterificada.

As flores secas de *T. erecta* ou seus extratos são usados em rações para aves com o objetivo de intensificar a coloração da sua pele e da gema de seus ovos. A utilização biológica de luteína foi investigada por Philip et al. (1976) que alimentaram galinhas poedeiras com rações enriquecidas com ésteres de luteína de diferentes fontes, inclusive de pétalas de *T. erecta*, ou com luteína cristalina. Os resultados indicaram que a luteína acilada é melhor utilizada pelas aves do que a luteína cristalina. Philip e Berry (1975) destacaram a importância do uso comercial de ésteres de xantofilas para colorir produtos alimentícios, devido à elevada solubilidade dos ésteres de luteína em óleo vegetal.

As propriedades biológicas da luteína extraída das flores de *T. erecta* foram constatadas em diversos estudos. Por exemplo, essa luteína inibiu a atividade mutagênica de 1-nitropireno em *Salmonella typhimurium*, provavelmente pela formação de um complexo entre a luteína e o 1-nitropireno, o qual poderia limitar a biodisponibilidade deste último (Mejía et al., 1997). Em um outro estudo, a luteína de extratos de *T. erecta* supriu o crescimento de tumores mamários e realçou a proliferação de linfócitos em ratos (Chew et al., 1996; Park et al., 1997). Com humanos foi demonstrado que ésteres de luteína de extratos de *T. erecta* são absorvidos eficientemente na corrente sanguínea (Bowen et al., 1997). Esse resultado foi reforçado por um outro experimento no qual houve um aumento nos níveis de luteína no plasma e na densidade óptica do pigmento macular após a ingestão de luteína extraída de flores de *T. erecta* (Landrum et al., 1997). O benefício destes efeitos foi demonstrado por estudos epidemiológicos que constataram uma relação inversa significativa entre o consumo de luteína e zeaxantina (Seddon et al., 1994) ou níveis plasmáticos destes carotenóides (EDDC, 1993) e o risco de degeneração macular. Embora as flores de *T. erecta* sejam usadas na medicina mexicana tradicional (Neher, 1968; Mendieta e Del-Amos, 1981), as mesmas não são empregadas freqüentemente na medicina convencional. Um dos raros exemplos é o agente oftalmológico (Adaptinol), extraído de pétalas desta flor e constituído principalmente de luteína dipalmitato (Gau et al., 1983).



Os trabalhos citados mostram que a luteína parece desempenhar funções biológicas importantes não apenas em animais, mas também em humanos. Como no Brasil existe uma diversidade de flores de colorações laranjas e amarelas que podem provavelmente ser fonte de luteína, o presente trabalho teve como meta caracterizar e quantificar os carotenóides principais das flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonía trilobata*, as quais crescem espontaneamente e florescem praticamente ao longo de todo o ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material.** Flores laranjas e amarelas de *Cosmos sulphureus* e amarelas de *Thelechitonía trilobata* foram coletadas em diferentes locais do Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP e identificadas pelo Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (Figura 1). Após a coleta das flores, suas flores centrais e periféricas (pétalas) eram destacadas e misturadas (flor completa) ou mantidas separadas para serem analisadas individualmente. O peso das amostras submetidas à análise variou de 0,11 a 0,25 g.

Na análise das flores laranjas de *C. sulphureus*, o número de lotes avaliados para flores completas e periféricas foi de sete e seis, respectivamente, sendo que de cada um destes lotes foi retirada uma amostra de cinco unidades. A distribuição de luteína nas flores foi estimada pela análise individual de flores centrais e periféricas de uma amostra de 15 unidades de flores coletadas de um mesmo lote.

No caso das flores amarelas completas de *C. sulphureus*, uma amostra constituída de três unidades foi coletada de cada um dos três lotes avaliados. Na análise das flores periféricas, uma amostra de duas unidades foi retirada de cinco lotes, sendo que três destes lotes eram próximos entre si.

Na análise das flores completas de *T. trilobata*, uma amostra de duas unidades foi retirada de um lote. Para flores periféricas, uma amostra constituída de quatro unidades foi coletada de seis lotes: dois pares de lotes de localidades distantes e outros dois lotes distantes entre si e dos demais. A distribuição de luteína nas flores foi avaliada analisando-se as flores centrais e periféricas de uma amostra com quatro unidades de um lote e uma outra amostra de 11 unidades de um outro lote.



(A)



(B)

**Figura 1.** Fotos das flores de (A) *Cosmos sulphureus* e (B) *Thelechitonina trilobata*.

**Extração e Saponificação.** Os pigmentos das amostras foram extraídos exhaustivamente com acetona e na presença de hiflosupercel em um almofariz. A seguir o extrato foi separado por filtração e transferido para éter de petróleo:éter etílico (3:1), com auxílio de água destilada. O vestígio de água no extrato foi eliminado pela adição de sulfato de sódio anidro. A saponificação foi realizada para verificar a presença de carotenóides esterificados, utilizando uma solução metanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. Essa reação ocorreu na ausência de luz e em temperatura ambiente por 12 h. A retirada completa do álcali foi realizada através de sucessivas lavagens com água destilada, sendo o vestígio de água eliminado como citado anteriormente.

**Identificação.** A identificação da luteína baseou-se na avaliação conjunta das seguintes informações: (1) comportamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e em cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel desenvolvida com 5% de metanol em tolueno, (2) espectro de absorção no visível e (3) reações químicas específicas (Liaaen-Jensen, 1971; Eugster, 1995). A configuração geométrica (*cis* ou *trans*) foi verificada pela reação de fotoisomerização catalisada por iodo com o carotenóide dissolvido em éter de petróleo. A presença de grupo hidroxílico em posição alílica foi confirmada pela reação de metilação, que consiste na adição de gotas de HCl 0,2N ao carotenóide dissolvido em metanol. Após 3 h de reação no escuro e à temperatura ambiente, o pigmento é transferido para éter de petróleo. O pigmento metilado e o não metilado são aplicados em placa de sílica gel, desenvolvida com 5% metanol em tolueno. Um valor de  $R_f$  maior para o pigmento metilado indica reação de metilação positiva.

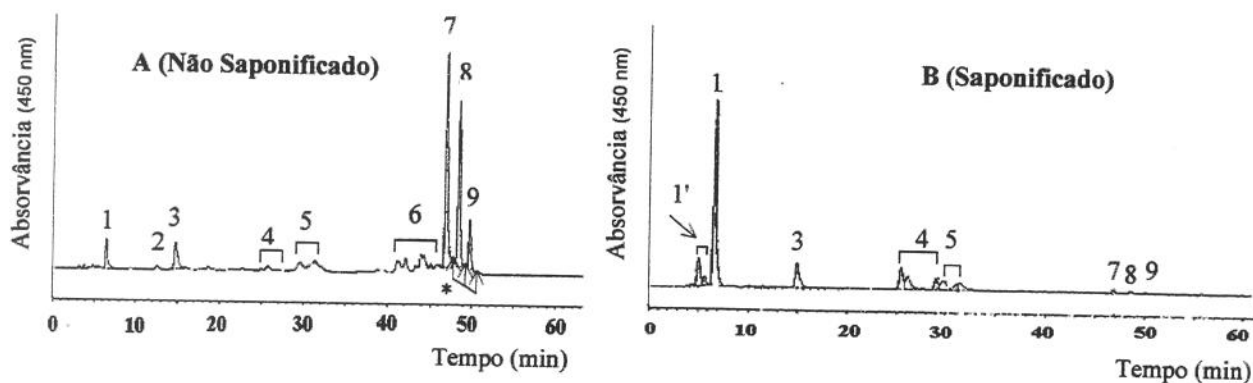
**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** Extratos saponificados ou não saponificados foram concentrados em roto evaporador à temperatura máxima de 35°C e secos em corrente suave de nitrogênio. Os pigmentos foram redissolvidos em acetona grau HPLC e filtrados em membranas de 0,45 µm de porosidade (Millipore), sendo a seguir injetados em um cromatógrafo a líquido (Varian, modelo 9010) munido de um injetor (Rheodyne) com alça de amostragem de 10 µl e de um detector por arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 994). Os espectros de absorção no visível foram obtidos no intervalo de 300 a 600 nm e os cromatogramas monitorados a 450 nm. Uma coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>) Spherisorb ODS-2 (Allrich), com partículas de 5 µm e dimensões de 250 x 4,6 mm, foi utilizada para separação dos pigmentos. O gradiente utilizado era formado por metanol-água-acetato de etila variando de (25:20:55) para (25:1:74) em 57 min, permanecendo na última proporção por 13 min, totalizando 70 min de corrida. O tempo de re-equilíbrio foi de 10 min e a vazão usada foi de 0,6 ml/min.

**Quantificação.** Os teores de luteína, em éter de petróleo, foram obtidos de acordo com a Lei de Beer, utilizando o valor de  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  de 2600, o qual foi calculado segundo Davis (1976). Considerou-se que a absorção máxima do extrato total não saponificado era relativa exclusivamente a luteína (principalmente na forma esterificada), uma vez que os demais carotenóides estavam presentes em baixas concentrações. Os espectros de absorção foram obtidos através de um espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640) na faixa de comprimentos de onda 300 a 600 nm. Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância e Teste de Tukey para diferença entre médias ao nível de 5% de confiabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

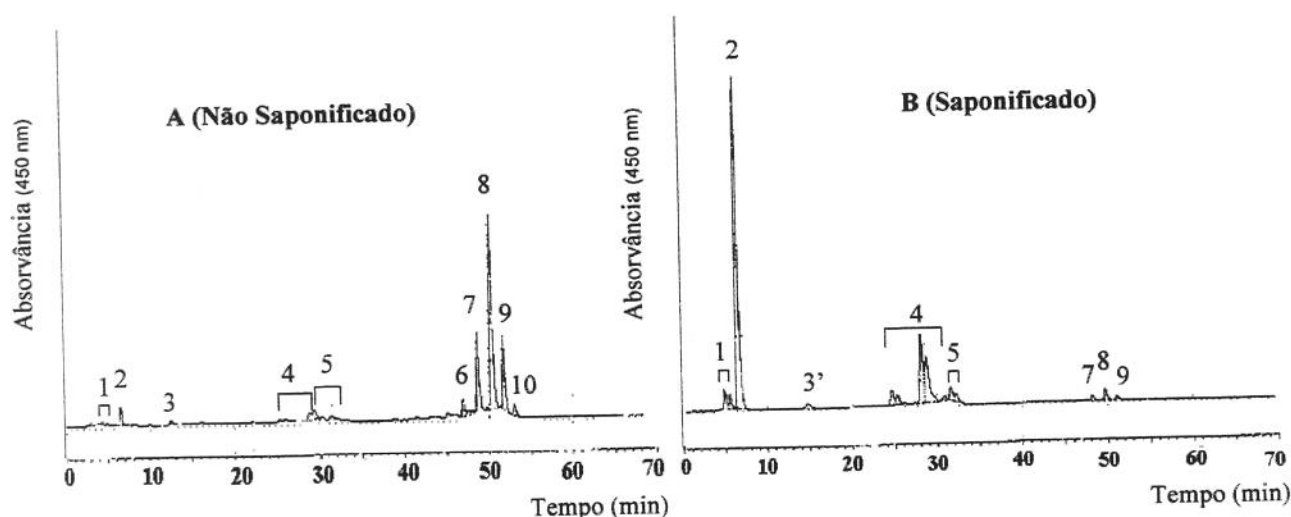
As Figuras 2 e 3 mostram os cromatogramas de extratos saponificado e não saponificado dos carotenóides das flores de *C. sulphureus* e *T. trilobata*, respectivamente. Em todas as amostras não saponificadas houve a predominância de *trans*-luteína na forma de diésteres e a presença de uma pequena quantidade de *trans*-luteína livre (Figura 2A e 3A). Foi observado também, traços de monoésteres de luteína e diésteres de *cis*-luteína. Estes carotenóides foram identificados através de seus tempos de retenção e espectros de absorção no visível. Com a saponificação das

amostras houve um aumento nítido do pico da *trans*-luteína livre (Figuras 2 B: pico 1 e Figura 3B: pico 2) e o conseqüente desaparecimento ou diminuição dos picos de seus respectivos diésteres. O aumento dos picos dos monoésteres de luteína (Figuras 2 B e 3B), indica que a reação de saponificação não foi completa. Como a luteína livre e esterificada apresentam o mesmo cromóforo, seus espectros de absorção na região do visível são idênticos (Figura 4). A abundância de luteína esterificada nas amostras foi semelhante à encontrada nas flores de *Tagetes erecta* por Quackenbush e Miller (1972). O pico 3 nos cromatogramas de *C. sulphureus* (Figura 2) e o pico 3' no cromatograma de *T. trilobata* (Figura 3) foram tentativamente identificados como  $\alpha$ - e  $\beta$ -criptoxantina, respectivamente, através de seus tempos de retenção e espectros de absorção no visível (Figura 4).

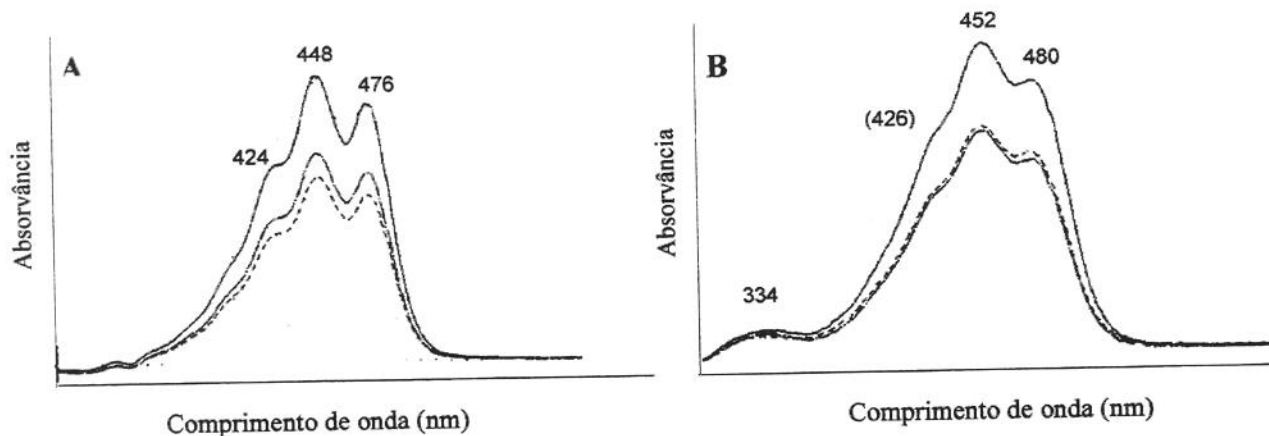


**Figura 2.** Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extratos não saponificado (A) e saponificado (B) de flores laranjas de *C. sulphureus*. 1'- isômeros de *cis*-luteína; 1- *trans*-luteína; 2- clorofila; 3-  $\alpha$ -criptoxantina; 4- monoésteres de luteína; 5- carotenos; 6- diésteres de luteína + carotenóides minoritários não identificados; 7, 8 e 9- diésteres de *trans*-luteína; \*- diésteres de *cis*-luteína. Coluna: Spherisorb ODS-2 (C<sub>18</sub>), 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila variando de (25:20:55) a (25:1:75) em 57 min, permanecendo nesta última proporção por mais 13 min.





**Figura 3.** Cromatogramas, obtidos por CLAE, de extratos não saponificado (A) e saponificado (B) das flores de *T. trilobata*. 1- isômeros de *cis*-luteína; 2- *trans*-luteína; 3- clorofila; 3'-  $\beta$ -criptoxantina; 4- monoésteres de luteína; 5- carotenos; 6, 7, 8, 9 e 10- diésteres de *trans*-luteína. As condições cromatográficas estão descritas na Figura 2.



**Figura 4.** Espectros de absorção no visível da  $\alpha$ -criptoxantina, *trans*-luteína e de seus ésteres (A) e  $\beta$ -criptoxantina (B), obtidos pelo DAD, no início (---), meio (—) e fim (---) da eluição destes pigmentos durante a análise por CLAE. Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila variando de (25:20:55) a (25:1:75) em 57 min, permanecendo nesta última proporção por mais 13 min.

Foi encontrado um teor médio de 670 e 690  $\mu\text{g/g}$  de luteína nas flores laranjas completas e periféricas de *C. sulphureus*, respectivamente (Tabela 1). Estas concentrações estão no mesmo nível dos teores de luteína encontrados nas pétalas de *T. erecta* por Gregory et al. (1986). Estes autores analisaram as pétalas de flores frescas de colorações amarelas esverdeadas, amarelas brilhantes, laranjas, laranjas escuras e laranjas marrons. A concentração dos ésteres de luteína nas pétalas amarelas esverdeadas era em torno de 4  $\mu\text{g/g}$  e nas laranjas marrons em torno 800  $\mu\text{g/g}$ . Entretanto, as flores exploradas comercialmente são as laranjas e laranjas escuras que apresentaram um valor em torno de 400 e 670  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.

**Tabela 1. Teores de Luteína nas Flores de *Cosmos sulphureus* ( $\mu\text{g/g}$  peso fresco)**

|                                  | N ° de Lotes     | Unidades/amostra | Luteína<br>(média ± DP) |
|----------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| <b><u>Flores Laranjas:</u></b>   |                  |                  |                         |
| Flores completas                 | 7 <sup>I</sup>   | 5                | 670 ± 90 a              |
| Flores Periféricas               | 6 <sup>I</sup>   | 5                | 690 ± 100 a             |
| Flores Periféricas <sup>II</sup> | 1                | 15               | 653                     |
| Centrais <sup>II</sup>           |                  |                  | 605                     |
| <b><u>Flores Amarelas:</u></b>   |                  |                  |                         |
| Flores completas                 | 3 <sup>I</sup>   | 3                | 660 ± 130 a             |
| Flores Periféricas               | 3 <sup>I</sup>   | 2                | 650 ± 80 a              |
| Flores Periféricas               | 3 <sup>III</sup> | 2                | 710 ± 60                |

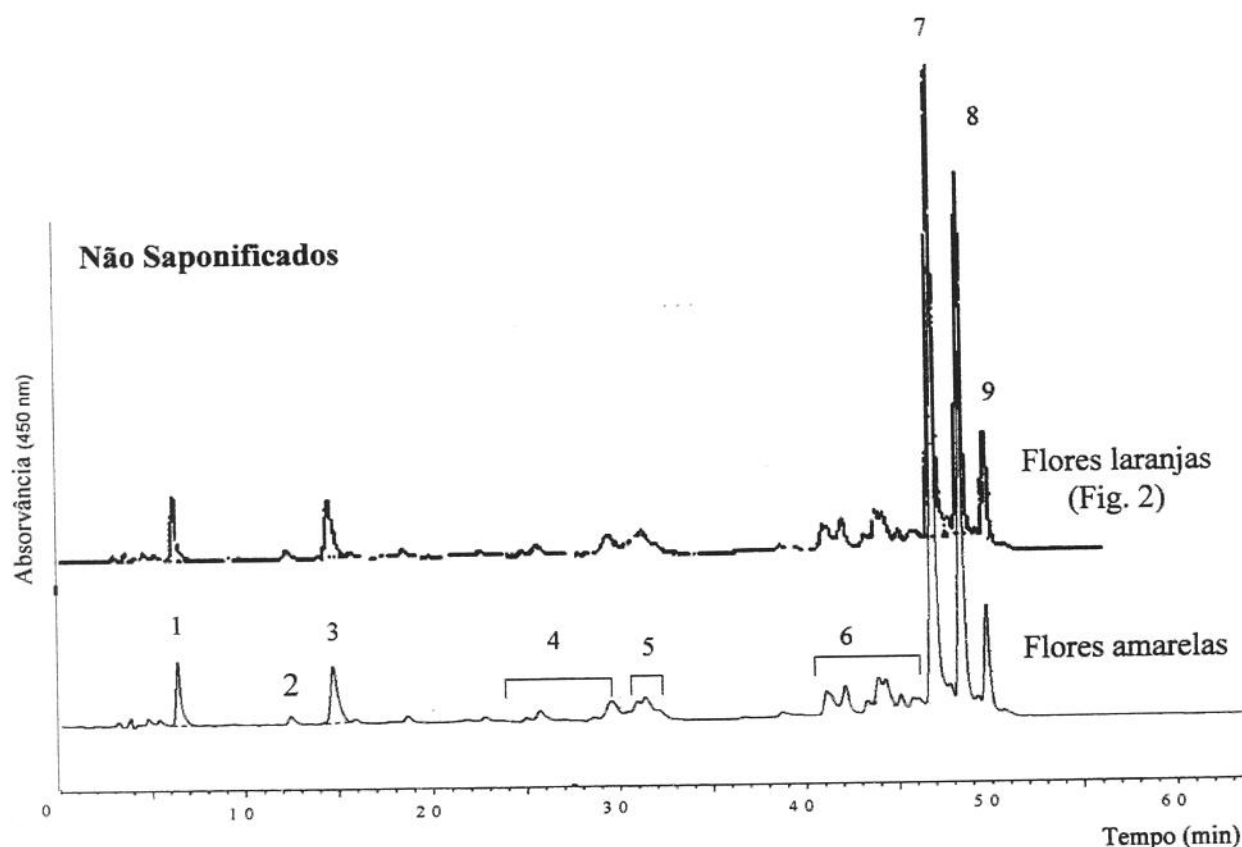
<sup>I</sup> lotes distantes entre si; <sup>II</sup> flores centrais e periféricas do mesmo lote; <sup>III</sup> lotes próximos entre si; médias com letras iguais na vertical não diferem significativamente entre si.

Para avaliar e comparar a concentração de luteína nas diferentes partes da flor laranja de *C. sulphureus*, foram analisadas separadamente as flores centrais e periféricas provenientes de 15 unidades de um mesmo lote. Verificou-se uma diferença de apenas 48  $\mu\text{g/g}$  (< 8 % da média), sugerindo que a luteína encontra-se distribuída igualmente nas flores.

A coloração das flores de *C. sulphureus* pode ser laranja ou amarela. Para verificar se essa diferença pode ser atribuída à concentração de carotenóides, foram analisadas também as flores amarelas. Os teores de luteína encontrados nas flores amarelas completas e periféricas (660 e 650  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) não diferiram significativamente entre si e nem dos valores obtidos para



flores laranjas. Além do mais, verificou-se nos cromatogramas da análise por CLAE que as flores amarelas e laranjas possuem a mesma proporção e perfil de carotenóides (Figura 5). Estes resultados indicam que as duas flores diferem na presença e/ou concentração de pigmentos que não sejam carotenóides, uma vez que a coloração das flores é determinada pela soma da absorção da luz de todos os pigmentos presentes.



**Figura 5.** Cromatogramas, obtido por CLAE, de extratos não saponificados das flores laranjas e amarelas de *C. sulphureus*. 1- *trans*-luteína; 2- clorofila; 3-  $\alpha$ -criptoxantina; 4- monoésteres de luteína; 5- carotenos; 6- diésteres de luteína + carotenóides minoritários não identificados; 7, 8 e 9- diésteres de *trans*-luteína. As condições cromatográficas estão descritas na Figura 2.

A variação do teor de luteína nas flores periféricas (amarelas) de *C. sulphureus* em relação à proximidade dos lotes pode ser estimada pelo desvio padrão dos lotes próximos e distantes (a significância não pode ser calculada, pois um dos lotes fazia parte dos dois grupos). Constatou-se que a variação do teor médio de luteína foi ligeiramente maior entre lotes de pontos distantes do que entre lotes próximos (80 e 60  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente).

A Tabela 2 mostra os teores de luteína encontrados nas flores completas, periféricas e centrais de *T. trilobata*. O teor médio de luteína nas flores periféricas dos seis lotes analisados foi de 820 µg/g. Este valor foi significativamente maior que o teor de luteína encontrado em flores amarelas e laranjas de *C. sulphureus*, e até maior que o valor citado anteriormente para as pétalas laranjas escuras de *T. erecta* (Gregory et al., 1986). A variação do teor de luteína em flores periféricas de *T. trilobata* de lotes próximos foi baixa (aproximadamente 2 e 6% das respectivas médias), enquanto as médias de lotes distantes (930 e 700 µg/g) diferiram significativamente entre si. Esta heterogeneidade pode ter sido causada por pequenas diferenças nas condições de crescimento, como o grau de exposição à luz solar, o qual aumenta o teor de carotenóides em frutas (Kimura et al., 1991; Cavalcante e Rodriguez-Amaya, 1992).

**Tabela 2. Teores de Luteína nas Flores de *Thelechetonia trilobata* (µg/g peso fresco)**

| <b>Flores Amarelas</b>                 | <b>Nº de Lotes</b> | <b>Unidades/amostra</b> | <b>Luteína<br/>(média ± DP)</b> |
|----------------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <b>Flores Completas</b>                | 1                  | 2                       | 790                             |
| <b>Flores Periféricas</b>              | 6 <sup>I</sup>     | 4                       | 820 ± 100                       |
| <b>Flores periféricas</b>              | 2 <sup>III</sup>   | 4                       | 930 ± 20 a                      |
|                                        | 2 <sup>III</sup>   | 4                       | 700 ± 40 b                      |
| <b>Flores Periféricas<sup>II</sup></b> | 1                  | 4                       | 730                             |
| <b>Centrais<sup>II</sup></b>           |                    |                         | 250                             |
| <b>Completas</b>                       |                    |                         | 370 <sup>IV</sup>               |
| <b>Flores Periféricas<sup>II</sup></b> | 1                  | 11                      | 1130                            |
| <b>Centrais<sup>II</sup></b>           |                    |                         | 360                             |
| <b>Completas</b>                       |                    |                         | 550 <sup>IV</sup>               |

<sup>I</sup> lotes distantes entre si; <sup>III</sup> lotes próximos entre si; <sup>II</sup> flores periféricas e centrais do mesmo lote; <sup>IV</sup> valor calculado a partir das médias do teor de luteína nas partes periféricas e centrais na proporção de 1:3; médias com letras minúsculas iguais na vertical não diferem significativamente entre si.

Para avaliar a distribuição de luteína nas diferentes partes das flores *T. trilobata*, as flores periféricas e centrais de dois lotes foram analisadas separadamente. O resultado mostrou que em ambos os lotes, a luteína é cerca de três vezes mais concentrada nas flores periféricas do que nas centrais, contrastando-se com a homogeneidade da distribuição da luteína em flores de *C. sulphureus*. Baseando-se nesta distribuição, o teor de luteína em flores completas de *T. trilobata* seria de 370 e 550 µg/g nos dois lotes analisados. Esses valores são inferiores ao teor medido na

amostra de flores completas (790 µg/g) e mostram que a distribuição relativa de luteína em flores de diferentes lotes se mantém, apesar de diferenças nos valores absolutos.

O teor médio de luteína nas flores periféricas de *C. sulphureus* (laranja) e *T. trilobata* de 690 e 820 µg/g, respectivamente, é apreciável e comparável ao valor máximo (800 µg/g) encontrado nas pétalas de *T. erecta* (Gregory et al., 1986). As flores de *T. erecta* apresentam um número de pétalas maior que as das flores analisadas e podem ter um peso maior. Porém, um teor considerável de luteína está presente nas flores centrais de *C. sulphureus* e *T. trilobata*, que possuem um peso duas e três vezes maior, respectivamente, que as pétalas. O fato das flores de *C. sulphureus* e *T. trilobata* crescerem espontaneamente e praticamente por quase todo o ano contribui ainda mais para a viabilidade do uso comercial das mesmas como fonte de luteína. Para este fim, recomenda-se a extração da flor completa, pois além de ser um procedimento mais simples e rápido, proporciona um rendimento maior de luteína.

## Referências Bibliográficas

- Bowen, P.E.; Hussain, E.; Stacewics-Sapuntzakis, M.; Damayanti, B.; Burns, J. Evaluation of bioavailability of lutein (L) and lutein diesters (LD) in humans. *FASEB J.* 1997, 11, 2587.
- Chew, B.P.; Wong, M.W.; Wong, T.S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res.* 1996, 16, 3689-3694.
- Cavalcante, M.L.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In *Food science and human nutrition*; Charalambous, G. Ed.; Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992, pp. 643-650.
- Davies, B.H. Carotenoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*; Goodwin, T.W. Ed.; Academic Press: London, 1976, Vol. 2, pp. 38-165.
- EDCC (Eye Disease Case-Control) Study Group. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 1993, 111, 104-109.
- Eugster, C.H. Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In *Carotenoids: isolation and analysis*, vol 1A; Britton, G., Liaaen-Jesen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhäuser Verlag Basel, 1995, pp. 71-80.
- Gau, W.; Ploschke, H.J.; Wünsche, C. Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid ester from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution. *J. Chromatogr.* 1983, 262, 277-284.

- Gregory, G.K.; Chen, T.S.; Philip, T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 1986, 51, 1093-1094.
- Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.; Yokoyama, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoids composition and vitamin A value of papaya. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1991, 24, 415-418.
- Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Joa, H.; Kilburn, M.D.; Moore, L.L.; Sprague, K.E. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp. Eye Res.* 1997, 65, 57-62.
- Liaaen-Jensen, S. Isolation, reactions. In *Carotenoids*; Isler, O., Ed.; Basel, Berkhauser Verlag, 1971, pp. 61-188.
- Mejía, E.G.; Loarca-Pina, G.; Ramos-Gómez, M. Antimutagenicity of xanthophylls in Aztec marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* 1997, 389, 219-226.
- Mendianta, R.M.; Del-Amos, S.R. Plantas medicinales del Estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, CECSA, Yucatán, México 1981, pp. 330.
- Neher, R.T. The ethnobotany of *Tagetes*. *Econ. Bot.* 1968, 22, 317-324.
- Park, J.S.; Chew, B.P.; Wong, T.S. Effect of dietary of lutein on growth of mammary tumor in BALB/c mice. *FASEB J.* 1997, 11, 2586.
- Philip, T.; Berry, J.W. Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *J. Food Sci.* 1975, 40, 1089-1090.
- Philip, T.; Weber, C.W.; Berry, J.W. Utilization of lutein and lutein-fatty acid esters by laying hens. *J. Food Sci.* 1976, 41, 23-25.
- Quackenbush, F.W.; Miller, S.L. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55, 617-621.
- Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 1994, 272, 1413-1420.
- Tosco, U. Diccionario de Botánica. Instituto Geográfico de Agostini, Teide, Barcelona, Spain, 1970, pp. 235.
- Vasudevan, P.; Kashyap, S.; Sharma, S. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technol.* 1997, 62, 29-35.

## **CAPÍTULO 4**

### **COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM FLORES DE *PYROSTEGIA VENUSTA***

# Carotenoid Composition of *Pyrostegia venusta* Flowers

Marise C. de Mello and Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP: 13081-970, Campinas, SP, Brasil

---

The carotenoid composition of *Pyrostegia venusta* flowers was determined by open column chromatography, complemented with high performance liquid chromatography. The total carotenoid concentration in the non-saponified sample was estimated to be 1300 µg/g fresh weight. Thirty-three carotenoids, including carotenes and xanthophylls (free and esterified), were identified in the *P. venusta* flowers. Rubixanthin and lycopene were the most abundant (31 and 13% of total carotenoids, respectively). These carotenoids were detected in the *trans*, *cis* and *poli-cis* geometric forms. Rubixanthin was the principal esterified xanthophyll, but esters of 9-*cis*-violaxanthin, *cis*-antheraxanthin and *cis*-zeaxanthin were also found in small amounts. The presence of several types of carotenoids with nutritional and/or antioxidant properties (β- and γ-carotene, β-cryptoxanthin, lycopene and rubixanthin), along with a high concentration of total carotenoids, indicate the viability of using this flower as source of natural colorant extract and food supplement of a mixture of carotenoids. Due to the complex composition of this flower, it is not indicated as source of specific carotenoids.

---

**Key Words:** *Pyrostegia venusta*, carotenoids, qualitative and quantitative composition, natural colorant



# Composição de Carotenóides em Flores de *Pyrostegia venusta*

Marise C. de Mello e Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP: 13081-970, Campinas, SP, Brasil

---

A composição de carotenóides em flores de *Pyrostegia venusta* foi determinada através da técnica de cromatografia em coluna aberta e complementada por cromatografia líquida de alta eficiência. A estimativa da concentração de carotenóides totais na amostra não saponificada foi de 1300 µg/g de peso fresco. Um total de 33 carotenóides, incluindo carotenos e xantofilas (livres e esterificadas), foi detectado nas flores de *P. venusta*. Os carotenóides mais abundantes foram a rubixantina e licopeno (31 e 13% do total de carotenóides, respectivamente). Estes pigmentos foram detectados nas formas geométricas *trans*, *cis* e poli-*cis*. A principal xantofila esterificada foi a rubixantina, enquanto os ésteres de 9-*cis*-violaxantina, *cis*-anteraxantina e *cis*-zeaxantina estavam presentes em pequenas quantidades. O conteúdo elevado de carotenóides totais e a presença de vários carotenóides com características nutricionais e/ou antioxidativas (β- e γ-caroteno, β-criptoxantina, licopeno e rubixantina) sugerem a viabilidade do uso das flores de *Pyrostegia venusta* como fonte de extrato de corante natural ou suplemento alimentar formado por uma mistura destes pigmentos. Devido à complexidade de sua composição, estas flores não seriam indicadas como fonte de extração de carotenóides específicos.

---

**Palavras Chaves:** *Pyrostegia venusta*, carotenóides, composição qualitativa e quantitativa, corante natural

## Introdução

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pela coloração de uma variedade de micro e macrorganismos, incluindo as flores amarelas, laranjas e vermelhas. O uso destes pigmentos como corante apresenta várias características vantajosas: são naturais, não são corrosivos, são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos e na presença de substâncias redutoras e possuem um alto valor nutricional e propriedades fisiológicas que beneficiam a saúde humana. Além de alguns carotenóides serem precursores de vitamina A (Bauernfeind et al., 1981), sua ingestão foi correlacionada com o fortalecimento do sistema imunológico (Bendich, 1989) e a redução do risco de várias doenças degenerativas como as cardiovasculares (Gerster, 1991; Gaziano e Hennekens, 1993; Manson et al., 1993; Kohlmeier e Hastings, 1995), o câncer (Block et al., 1992; Mayne e Goodwin, 1993; Giovannucci et al., 1995; Ziegler et al., 1996 a ,b; Mayne, 1996; King et al., 1997), a catarata (Jacques et al., 1988a e 1988b; Jacques e Chylack, 1991; Leske et al., 1991; Knekt et al., 1992) e a degeneração macular (Seddon et al., 1994; Snodderly, 1995; Khachik et al., 1997; Landrum et al., 1997). Estas qualidades justificam a preferência pelo seu uso alimentar e explicam o grande interesse na procura e caracterização de suas fontes.

Embora na Natureza exista uma grande variedade de flores que apresentam carotenóides, até o momento apenas as flores de *Tagetes erecta* são cultivadas comercialmente como fonte de luteína. Nas pétalas destas flores, a luteína encontra-se predominantemente na forma esterificada e dependendo da variedade, pode constituir cerca de 76 a 93% do total de carotenóides presentes (Quackenbush e Miller, 1972).

*Pyrostegia venusta* é uma planta trepadeira que cresce no sul do Brasil, Paraguai, Bolívia e no nordeste da Argentina (Sandwith & Hunt, 1974) e que floresce por um longo período com predominância nos meses de junho e julho, estendendo-se até meados de outubro (Gobatto-Rodrigues & Stort, 1992). As flores laranjas de *P. venusta* apresentam um potencial promissor como fonte comercial de carotenóides. Gusman e Gottsberger (1996) relataram que suas pétalas contêm 1910 µg carotenóides/g, valor bem maior que o encontrado para as pétalas laranjas e laranjas escuras de *Tagetes erecta* (em torno de 400 e 670 µg/g, respectivamente) por Gregory et al. (1986). Como a composição carotenóidica de flores de *P. venusta* ainda não é conhecida, o presente trabalho teve como objetivo determiná-la, como etapa preliminar para sua possível



utilização comercial. O interesse em analisar esta flor foi reforçado por sua abundância e pela característica rústica da planta, que uma vez semeada sempre volta a brotar espontaneamente.

## Material e Métodos

**Material.** Foram analisadas as flores laranjas de *Pyrostegia venusta* (Figura 1), conhecidas popularmente como flores de São João, as quais foram coletadas de diferentes pontos do Campus da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. Para determinar a composição qualitativa dos carotenóides destas flores, várias amostras (contendo de 9 a 15 unidades de flores) foram retiradas de diferentes lotes e logo a seguir picadas com tesoura, misturadas e porções de 1,2 a 1,4 g submetidas à análise. Para determinar a composição quantitativa, uma amostra (contendo 20 unidades de flores com um peso total de 5,6 g) foi coletada de um lote e após ser picada e misturada, uma porção de 1,7 g foi usada para proceder à quantificação. Para estimar a composição de carotenóides totais, foram feitas três extrações. As flores foram retiradas de três lotes (nove unidades) e as porções analisadas pesavam 1,0, 1,1 e 1,4 g.



**Figura 1:** Foto das flores de *Pyrostegia venusta*

**Composição de Carotenóides.** A composição dos carotenóides foi determinada segundo o método desenvolvido por Rodriguez et al. (1976) como descrito a seguir.

**1. Extração.** A extração dos pigmentos foi realizada em um almofariz com acetona resfriada e hiflosupercel seguida por filtração em funil sinterizado. Estes procedimentos se repetiram até que a extração fosse completa. Os pigmentos, em acetona, foram então transferidos em pequenas porções para éter de petróleo em um funil de separação, seguida pela adição de uma quantidade

suficiente de água destilada para auxiliar o processo de partição. Ao final da partição, o extrato etéreo total foi lavado com água destilada até que a acetona residual fosse eliminada.

**2. Saponificação.** Foi usada uma solução metanólica de KOH 10% na proporção de 1:1 em relação ao extrato. A reação ocorreu na ausência de luz e à temperatura ambiente por um período de 12 h. A retirada completa do álcali foi realizada através de sucessivas lavagens com água destilada e a água residual eliminada pela adição de sulfato de sódio anidro.

**3. Cromatografia em Coluna Aberta (CCA).** Após os extratos terem sido concentrados em evaporador rotatório à temperatura abaixo ou igual a 35°C, foram cromatografados em coluna aberta de vidro (20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro), empacotada a vácuo com uma mistura de MgO:Hiflosupercel (1:2) até uma altura de aproximadamente 12 cm. Para remover vestígios de água no extrato, foi adicionado sulfato de sódio anidro ao topo da fase estacionária. A coluna foi então acondicionada com éter de petróleo e a seguir a amostra foi aplicada. Para separar os pigmentos foi usado éter de petróleo seguido por concentrações crescentes de éter etílico e acetona em éter de petróleo, mantendo-se um gradiente de polaridade. Para carotenóides muito adsorvidos como o licopeno, empregou-se acetona e concentração crescente de água em acetona. As frações que ainda eram misturas foram recromatografadas em coluna de MgO:Hiflosupercel (1:1) ou de alumina neutra (óxido de alumínio neutro) atividade I ou III.

**4. Identificação.** A identificação das frações baseou-se na associação das seguintes informações: (1) comportamento em CCA, em cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel desenvolvida com 5% de metanol em tolueno e cromatografia líquida de alta eficiência (esta técnica não faz parte do método de Rodriguez et al. (1976), mas foi usada para complementar a identificação), (2) espectros de absorção na região do UV-visível, e (3) reações químicas específicas. Os espectros de absorção das frações separadas por CCA e dissolvidas em éter de petróleo foram obtidos em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640) na faixa de 300 a 600 nm e os valores comparados com os tabelados por Davies (1976) e Britton (1995). Foram realizadas as reações de fotoisomerização *cis-trans* catalisada por iodo, metilação com metanol acidificado, acetilação com anidrido acético, rearranjo epóxido-furanóide e redução com boridreto de sódio (Liaaen-Jensen, 1971; Eugster, 1995).

**5. Quantificação.** Os carotenóides isolados por CCA e dissolvidos em éter de petróleo foram quantificados por espectrofotometria, aplicando-se a Lei de Beer. As absorvâncias máximas



foram obtidas dos espectros de absorção das frações e os coeficientes de absorção usados ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) foram os tabelados por Davies (1976) e Britton, (1995) ou calculados segundo o primeiro autor.

**Carotenóides Totais.** Para estimar o total de carotenóides nas flores de *P. venusta*, após a extração dos pigmentos (conforme descrito acima), o extrato total não saponificado, dissolvido em éter de petróleo, foi quantificado por espectrofotometria. O coeficiente de absorção utilizado foi o do carotenóide majoritário da amostra, ou seja, o da rubixantina ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2750$ ), tabelado por Britton (1995).

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).** A análise por CLAE de extratos saponificados e não saponificados foi realizada para verificar a presença de carotenóides esterificados e comparar o perfil da composição destes pigmentos em CLAE com o obtido por CCA. Para tal, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de 35°C e secos sob uma corrente suave de nitrogênio. A seguir, os extratos foram redissolvidos em acetona, filtrados em membrana de 0,45 µm de porosidade (Millipore) e injetados em um cromatógrafo a líquido (Varian, modelo 9010), munido de um injetor (Rheodyne) com alça de amostragem de 10 µl e de um detector por arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 994). Os espectros de absorção dos carotenóides foram obtidos na faixa de 300 a 600 nm e os cromatogramas monitorados a 450 nm. Uma coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>) Spherisorb ODS-2 (Aldrich), com partículas de 5 µm e dimensões de 250 x 4,6 mm, foi utilizada para separação dos pigmentos. O gradiente utilizado era formado por metanol, água e acetato de etila variando de 25:20:55 para 25:1:74 em 57 min, permanecendo na última proporção por 13 min, totalizando 70 min de corrida. O tempo de re-equilíbrio foi de 10 min e a vazão utilizada foi de 0,6 ml/min. Os pigmentos isolados em CCA foram localizados em CLAE através de seus tempos de retenção e espectros de absorção no visível.

## Resultados e Discussão

**Composição Qualitativa.** Analisando-se em conjunto os dados obtidos por CCA e CLAE, foi detectado um total de 33 carotenóides (carotenos + xantofilas livres e esterificadas) nas flores de *Pyrostegia venusta*. A Tabela 1 apresenta as características dos carotenóides isolados do extrato saponificado e a Figura 2 mostra os espectros de absorção no visível, em éter de petróleo ou no eluente usado em CLAE. Todos os comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) medidos

no eluente da análise de CLAE foram maiores que os obtidos em éter de petróleo (Tabela 1). O espectro de absorção do extrato total da amostra (Figura 2) não apresentou perfil típico de um carotenóide, mas sim de uma mistura destes pigmentos.

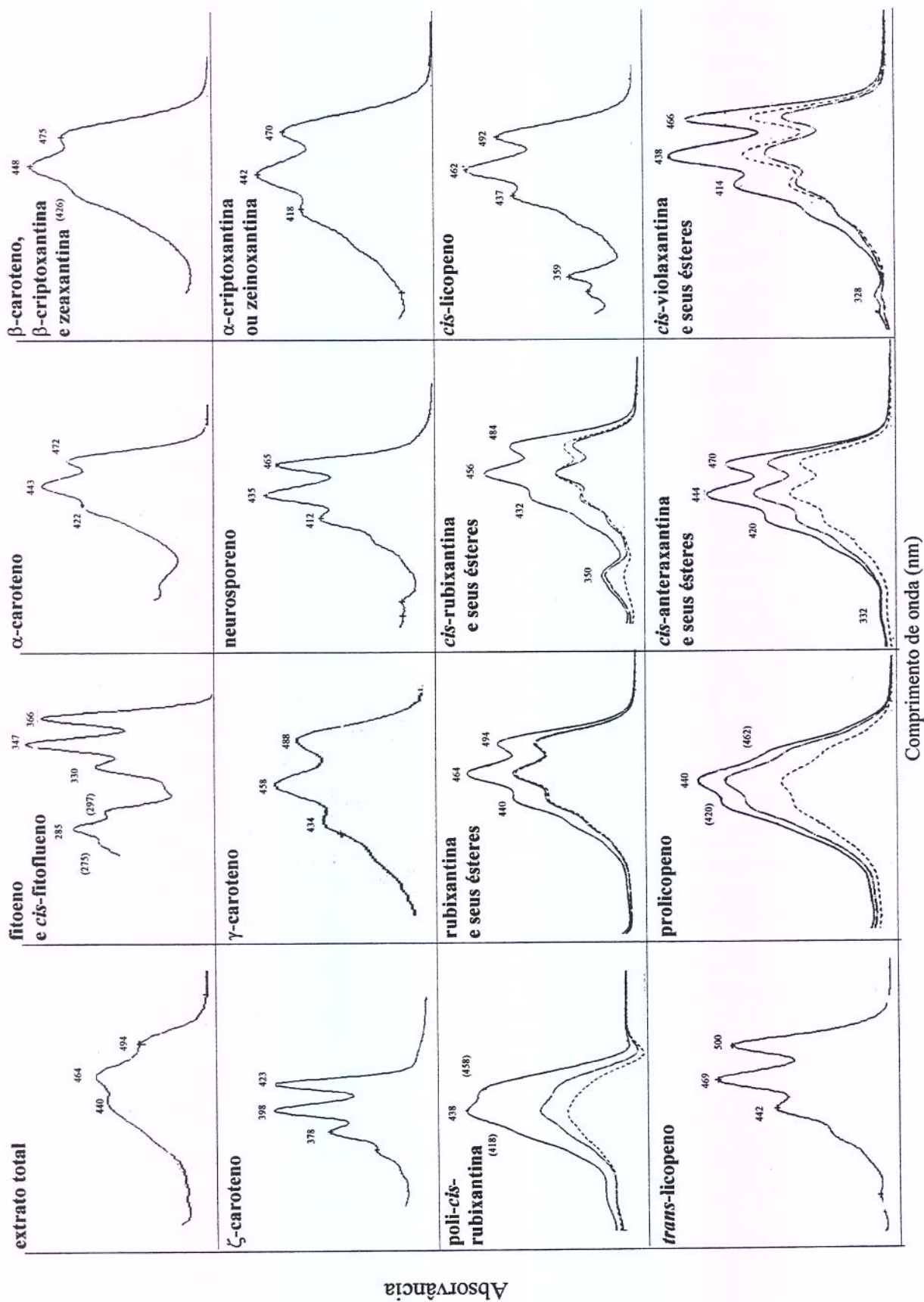
**Tabela 1. Características dos Carotenóides de Flores de *Pyrostegia venusta* Detectados por CCA e/ou CLAE**

| Carotenóides                         | $\lambda_{\text{máx}}^a$ (CCA)     | $R_f^b$ | Reações Químicas                  | $\lambda_{\text{máx}}^c$ (CLAE)    | $t_R^d$ (min) |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------|
| 9- <i>cis</i> -violaxantina          | 327 <sup>c</sup> , 414, 437, 466   | 0,08    | <i>cis</i> +, ep+                 | 328 <sup>c</sup> , 414, 438, 466   | 5,0           |
| <i>cis</i> -anteraxantina            | 328 <sup>c</sup> , 415, 437, 465   | 0,10    | <i>cis</i> +, ep+                 | 332 <sup>c</sup> , 420, 444, 470   | 5,6           |
| <i>cis</i> -zeaxantina               | 327 <sup>c</sup> , (423), 443, 468 | 0,12    | <i>cis</i> +, met-, acet+         | 332 <sup>c</sup> , 424, 446, 472   | 5,6           |
| zeaxantina                           | (426), 448, 475                    | 0,13    | <i>trans</i> +, ep*- met-, acet+  | (430), 454, 482                    | 6,3           |
| poli- <i>cis</i> -rubixantina        | (410), 430, (452)                  | 0,48    | <i>cis</i> +, red-, acet+         | (418), 438, (458)                  | 12,7          |
| rubixantina <sup>f</sup>             | 348 <sup>c</sup> , 433, 457, 486   | 0,48    | <i>trans</i> +, ep*-, met-, acet+ | 440, 464, 494                      | 13,4          |
| <i>cis</i> -rubixantina              | -----                              | -----   | -----                             | 350 <sup>c</sup> , 432, 456, 484   | 14,0          |
| $\alpha$ -criptoxantina <sup>g</sup> | 418, 442, 470                      | 0,49    | ep*-                              | -----                              | -----         |
| $\beta$ -criptoxantina               | (426), 448, 474                    | 0,50    | <i>trans</i> +, ep*-, met-, acet+ | (427), 450, 480                    | 14,0          |
| neurosporeno                         | 412, 435, 465                      | 0,98    | <i>trans</i> +                    | 418, 444, 472                      | 24,1          |
| prolicopeno                          | (416), 440, (463)                  | 0,98    | <i>cis</i> +                      | (420), 440, (462)                  | 25,0          |
| <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno       | -----                              | -----   | -----                             | 336 <sup>c</sup> , (424), 448, 474 | 26,0          |
| licopeno                             | 442, 469, 500                      | 0,98    | <i>trans</i> +                    | 452, 476, 506                      | 26,7          |
| <i>cis</i> -licopeno                 | 359 <sup>c</sup> , 437, 462, 492   | 0,98    | <i>cis</i> +                      | 362 <sup>c</sup> , 444, 470, 496   | 28,2          |
| $\gamma$ -caroteno                   | 434, 458, 488                      | 0,98    | <i>trans</i> +                    | 444, 468, 496                      | 28,2          |
| fitoeno                              | (275), 285, (297)                  | -----   | -----                             | -----                              | -----         |
| <i>cis</i> -fitoflueno               | 330, 347, 366                      | -----   | <i>cis</i> +                      | 332, 348, 366                      | 29,4          |
| $\zeta$ -caroteno                    | 378, 398, 423                      | 0,98    | <i>trans</i> +                    | 382, 404, 430                      | 29,4          |
| <i>cis</i> - $\zeta$ -caroteno       | 376, 396, 421                      | 0,98    | <i>cis</i> +                      | -----                              | -----         |
| $\alpha$ -caroteno                   | 422, 443, 472                      | 0,98    | <i>trans</i> +                    | -----                              | -----         |
| $\beta$ -caroteno <sup>f</sup>       | 333 <sup>c</sup> , (425), 446, 473 | 0,98    | <i>trans</i> +                    | (430), 452, 482                    | 29,4          |

<sup>a</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtidos por espectrofotômetro, referentes às bandas (em éter de petróleo) separadas por CCA; <sup>b</sup> valores obtidos em placa de sílica gel desenvolvida com 5% metanol/tolueno; <sup>c</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtido pelo DAD, referentes aos picos da análise de CLAE (Figura 4). Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila; <sup>d</sup> tempo de retenção dos picos da Figura. 4; <sup>e</sup> pico *cis*; <sup>f</sup> presença de pico *cis* nos valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  do carotenóide separado por CCA, mas a reação de fotoisomerização indicou presença majoritária da forma *trans*; <sup>g</sup> ou zeinoxantina; ( ) - indica ombro no lugar de pico; met - metilação; acet - acetilação; red - redução; ep\* - epóxido (somente exposição à vapores de HCl concentrado); ep - (exposição à vapores de HCl concentrado e rearranjo epóxido-furanóxido).

Através da separação por CCA (Figura 3), foram encontrados 12 carotenos (fitoeno, *cis*-fitoflueno, neurosporeno, prolicopeno, *trans*- e *cis*-licopeno, *trans*- e *cis*- $\zeta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e *trans* e *cis*- $\beta$ -caroteno) e 9 xantofilas (9-*cis*-violaxantina, *cis*-anteraxantina, *trans*- e *cis*-zeaxantina, poli-*cis*-, *trans*- e *cis*-rubixantina,  $\beta$ -criptoxantina e  $\alpha$ -criptoxantina ou zeinoxantina).





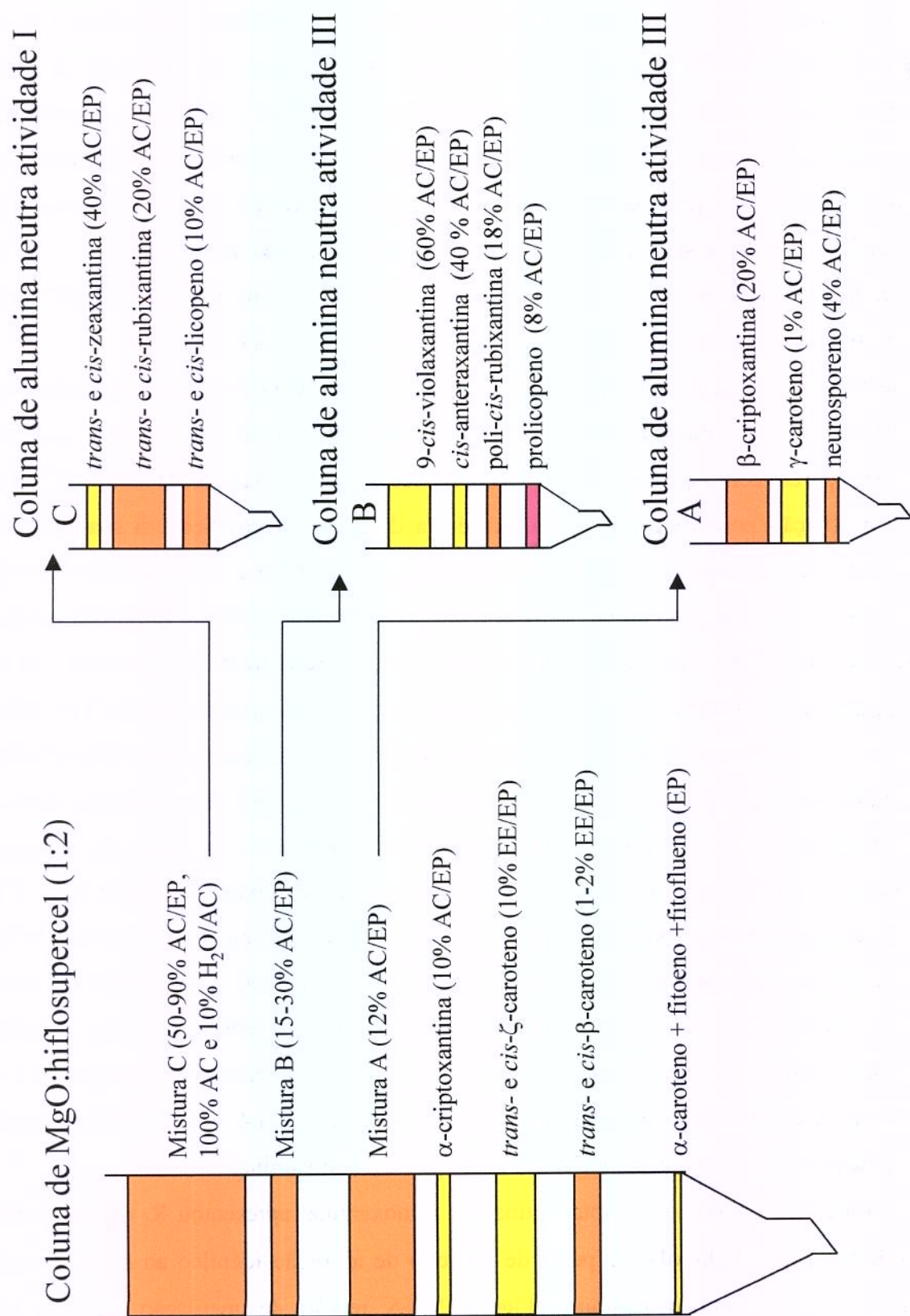
**Figura 2.** Espectros de absorção dos carotenóides detectados nas flores de *Pyrostegia venusta*, dissolvidos em éter de petróleo (obtidos por espectrofotômetro e representado por uma única linha contínua) ou no eluente usado em CLAE (obtidos por DAD e representado por três linhas indicando a medida no início (---), meio (—) e fim (...) dos picos da Figura 4 – Fase móvel: gradiente formado por metanol-água-acetato de etila.

Os carotenos foram identificados por seus espectros de absorção característicos (Figura 2) e pela ausência de grupo funcional oxigenado em suas moléculas. A ausência destes grupos faz com que os carotenos corram junto com a frente de solvente na camada delgada. Dentre eles, o licopeno foi o mais abundante e estava presente nas formas *trans*, *cis* e poli-*cis*. A fração caracterizada como poli-*cis*-licopeno, ou prolicopeno, apresentou espectro de absorção no visível com baixa definição (Figura 2), uma propriedade típica de cetocarotenóides. Porém, como seu  $R_f$  não indicava presença de grupo substituinte, a reação de redução com boridreto de sódio não foi realizada. Ao ser submetida à reação de fotoisomerização catalisada por iodo, seu espectro de absorção passou a ser semelhante ao do *cis*-licopeno, com um pico *cis* a 359 nm e  $\lambda_{max}$  a 438, 463 e 492 nm, concluindo sua identificação como poli-*cis*-licopeno.

Entre as xantofilas, a rubixantina era a mais abundante, sendo também o carotenóide principal da amostra. A fração correspondente a este pigmento apresentou perfil de absorção semelhante ao  $\gamma$ -caroteno, porém com  $\lambda_{max}$  de 1 a 2 nm menores. Seu  $R_f$  foi típico de um monoidroxilado e a reação de acetilação positiva confirmou a existência de grupo hidroxílico em sua molécula, enquanto que a reação de metilação negativa indicou que este grupo encontrava-se em posição não alílica em relação à ligação dupla. Embora a reação de fotoisomerização catalisada por iodo indicasse que este pigmento apresentava a forma *trans*, a presença de um pico *cis* em seu espectro de absorção a 348 nm e  $\lambda_{max}$  um pouco menores que do  $\gamma$ -caroteno (Tabela 1) revelaram uma mistura dos isômeros *trans*- e *cis*-rubixantina. Todavia, os espectros destes dois isômeros foram obtidos pelo DAD (Figura 2). A rubixantina foi também isolada na forma poli-*cis*. A fração correspondente a este pigmento apresentou  $R_f$  que indicava a presença de um grupo hidroxila em sua molécula e espectro de absorção no visível com baixa definição (Figura 2). Entretanto, este pigmento respondeu negativamente à redução com boridreto de sódio, o que eliminou a hipótese do mesmo ser um cetocarotenóide. Um cetocarotenóide teria seu grupo carbonílico transformado em grupo hidroxílico e passaria a apresentar três máximos característicos. Porém, ao ser submetida à reação de fotoisomerização, seu espectro passou a ser semelhante ao da *cis*-rubixantina com um pico *cis* a 344 nm e  $\lambda_{max}$  a 431, 453 e 482 nm, sendo este o parâmetro decisivo na sua identificação como poli-*cis*-rubixantina.

A fração identificada como  $\alpha$ -criptoxantina, ou zeinoxantina, apresentou  $R_f$  que indicava a presença de um grupo hidroxílico e perfil de espectro de absorção idêntico ao do  $\alpha$ -caroteno, porém com  $\lambda_{max}$  um pouco menores (Figura 2). A reação de metilação definiria esta





**Figura 3.** Esquema da separação dos carotenóides de flores de *Pyrostegia venusta* por CCA. AC- acetona; EE- éter etílico; EP- éter de petróleo.

caracterização, pois enquanto a  $\alpha$ -criptoxantina apresenta seu grupo hidroxílico em posição alílica, a zeinoxantina não. Entretanto, não houve material suficiente para este teste.

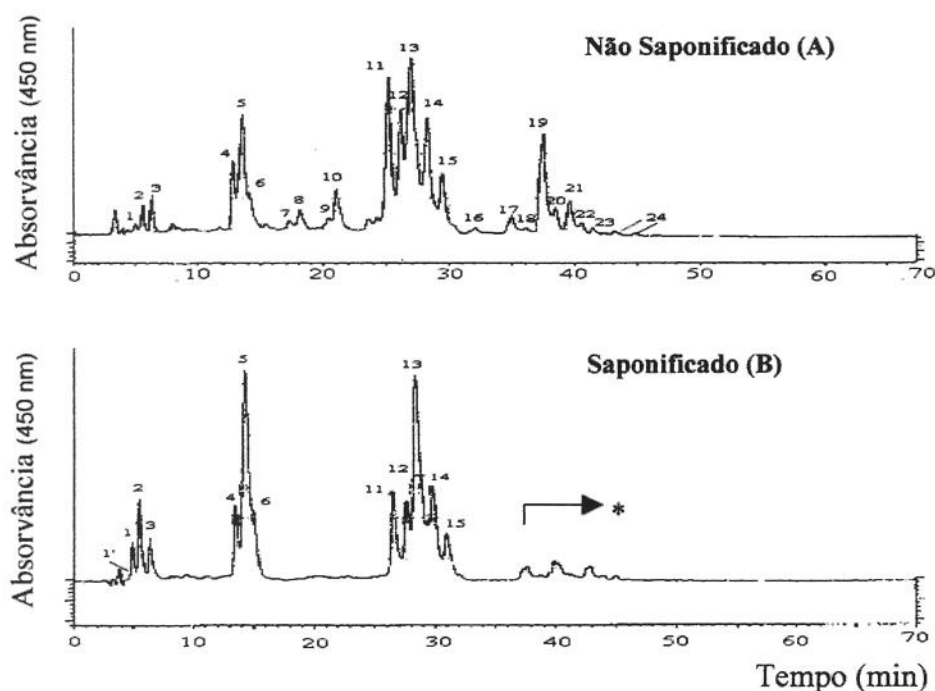
*Trans*- $\beta$ -criptoxantina foi identificada através do valor de seu  $R_f$  típico de um monoidroxilado, espectro de absorção no visível semelhante ao do  $\beta$ -caroteno (Figura 2) e reação positiva à acetilação, mas negativa à metilação.

*Trans*-zeaxantina apresentou  $R_f$  típico de um diidroxilado, espectro de absorção no visível semelhante ao do  $\beta$ -caroteno (Figura 2) e reação positiva à acetilação, mas negativa à metilação. A forma *cis* deste pigmento apresentou as mesmas características que a forma *trans*, com exceção de seus  $\lambda_{max}$  serem menores e apresentar pico *cis* a 327 nm (Tabela 1).

A fração correspondente a *cis*-anteraxantina apresentou  $R_f$  típico de um diidroxilado e perfil de absorção semelhante ao da luteína (Figura 2). Ao ser exposta a vapores de HCl concentrado, sua cor mudou de amarelo para azul, revelando possuir um grupo epóxido. A presença de apenas um grupo 5,6-epóxido em sua molécula foi confirmada quando a fração, dissolvida em etanol, reagiu com gotas de HCl 0,1N e um efeito hipsocrômico de 17 nm em seus  $\lambda_{max}$  foi observado.

A fração correspondente a *cis*-violaxantina apresentou  $R_f$  indicativo de um diidroxilado, mudou para azul quando exposta a vapores de HCl concentrado e exibiu efeito hipsocrômico de 38 nm em solução etanólica com gotas de HCl 0,1N, indicando a presença de dois grupos 5,6-epóxidos em sua molécula. Devido a presença de um pico *cis* de baixa intensidade em espectro de absorção (Figura 2) foi identificada tentativamente como 9-*cis*-violaxantina.

O perfil da composição de carotenóides em CLAE é mostrado na Figura 4. Todos os carotenóides isolados por CCA, com exceção do fiteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\alpha$ -criptoxantina foram detectados. O fiteno não foi encontrado, pois absorve comprimentos de ondas abaixo da faixa usada de 300 a 600 nm. O  $\alpha$ -caroteno e  $\alpha$ -criptoxantina apresentam polaridades semelhantes às do  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, respectivamente e poderiam ter eluído junto com estes pigmentos. Além disto, o  $\alpha$ -caroteno e  $\alpha$ -criptoxantina estavam presentes em baixas concentrações e provavelmente foram mascarados. A análise por CLAE também detectou as formas isoméricas *trans*, *cis* e poli-*cis* da rubixantina (Figura 4- picos 4, 5 e 6) e do licopeno (Figura 4- picos 11, 13 e 14) e confirmou a predominância destes pigmentos na amostra. Os picos de poli-*cis*-, *trans*- e *cis*-rubixantina eluíram muito próximos e o último deles concomitantemente com o pico da  $\beta$ -criptoxantina. A *cis*-anteraxantina e *cis*-zeaxantina também eluíram juntas (Figura 4- pico 2).



**Figura 4.** Cromatogramas dos extratos não saponificado e saponificado dos carotenóides das flores de *Pyrostegia venusta*: 1'- 13-*cis*-violaxantina; 1- 9-*cis*-violaxantina; 2- *cis*-anteraxantina + *cis*-zeaxantina; 3- zeaxantina; 4- poli-*cis*-rubixantina; 5- rubixantina; 6- *cis*-rubixantina +  $\beta$ -criptoxantina +  $\alpha$ -criptoxantina (ou zeinoxantina); 7- monoéster de 9-*cis*-violaxantina; 8 e 9- mistura de monoésteres de *cis*-anteraxantina, 9-*cis*-violaxantina e *cis*-zeaxantina; 10- mistura de monoésteres de *cis*-anteraxantina e *cis*-zeaxantina; 11- prolicopeno; 12-*cis*- $\beta$ -caroteno; 13- licopeno; 14- *cis*-licopeno +  $\gamma$ -caroteno; 15- fitoflueno +  $\zeta$ -caroteno +  $\alpha$ -caroteno +  $\beta$ -caroteno; 16, 17, 19 e 21- monoésteres de rubixantina; 18 e 20- monoésteres de *cis*-rubixantina; 22 e 23- diésteres de *cis*-zeaxantina; 24- diésteres de *cis*-anteraxantina. \* resíduo de monoésteres de rubixantina. Coluna: Spherisorb ODS-2 ( $C_{18}$ ), 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m - Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila variando de (25:20:55) a (25:1:75) em 57 min, permanecendo nesta última proporção por mais 13 min.

A análise de extratos saponificado e não saponificado por CLAE revelou a presença de carotenóides esterificados (Figura 4A e B). O critério na identificação dos ésteres presentes foi o desaparecimento de alguns picos no cromatograma do extrato não saponificado, acompanhado pelo aumento de outros no cromatograma do extrato saponificado e a semelhança entre seus perfis de espectros e  $\lambda_{\text{max}}$  no visível. Os monoésteres de *trans*-rubixantina (Figura 4A- picos 16, 17, 19 e 21) eram os mais abundantes. A forma *cis* deste monoéster foi também detectada (Figura 4A- picos 18 e 20). Os demais ésteres estavam presentes em quantidades menores e foram identificados, tentativamente (levando-se em conta o seu tempo de retenção), como sendo monoéster de 9-*cis*-violaxantina (Figura 4A- pico 7), mistura de monoésteres de *cis*-anteraxantina, 9-*cis*-violaxantina e *cis*-zeaxantina (Figura 4A- pico 8 e 9) e mistura de monoésteres de *cis*-anteraxantina e *cis*-zeaxantina (Figura 4A- pico 10). A Tabela 2 apresenta os  $\lambda_{\text{max}}$  e os tempos de retenção obtidos para estes carotenóides esterificados. Após a saponificação



foi observado um aumento nos picos 1 (9-*cis*-violaxantina), 2 (*cis*-anteraxantina + *cis* zeaxantina) e 5 (rubixantina) e a presença de resíduos de ésteres de rubixantina, indicando que a saponificação foi incompleta (Figura 4B).

**Tabela 2. Carotenóides Esterificados Detectados no Extrato não Saponificado de *P. venusta* por CLAE**

| Carotenóides                                                                                           | $\lambda_{\max}$                 | $t_R^b$ |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------|
| monoéster de 9- <i>cis</i> -violaxantina                                                               | 328 <sup>c</sup> , 414, 438, 466 | 17,2    |
| mistura de monoésteres (9- <i>cis</i> -vioxantina, <i>cis</i> -anteraxantina e <i>cis</i> -zeaxantina) | 420, 446, 472                    | 18,1    |
| mistura de monoésteres (9- <i>cis</i> -vioxantina, <i>cis</i> -anteraxantina e <i>cis</i> -zeaxantina) | 412, 436, 468                    | 20,3    |
| mistura de monoésteres ( <i>cis</i> -anteraxantina e <i>cis</i> -zeaxantina)                           | 422, 444, 470                    | 21,0    |
| monoéster de rubixantina                                                                               | 440, 464, 494                    | 32,1    |
| monoéster de rubixantina                                                                               | 440, 464, 494                    | 34,9    |
| monoéster de <i>cis</i> -rubixantina                                                                   | 352 <sup>c</sup> , 432, 454, 482 | 36,1    |
| monoéster de rubixantina                                                                               | 440, 464, 494                    | 37,3    |
| monoéster de <i>cis</i> -rubixantina                                                                   | 352 <sup>c</sup> , 432, 454, 482 | 38,4    |
| monoéster de rubixantina                                                                               | 440, 464, 494                    | 39,5    |
| diéster de <i>cis</i> -zeaxantina                                                                      | 332 <sup>c</sup> , 420, 446, 472 | 40,5    |
| diéster de <i>cis</i> -zeaxantina                                                                      | 332 <sup>c</sup> , 420, 446, 472 | 41,3    |
| diéster de <i>cis</i> -anteraxantina                                                                   | 332 <sup>c</sup> , 420, 444, 472 | 43,1    |
| diéster de <i>cis</i> -anteraxantina                                                                   | 332 <sup>c</sup> , 420, 444, 472 | 44,7    |

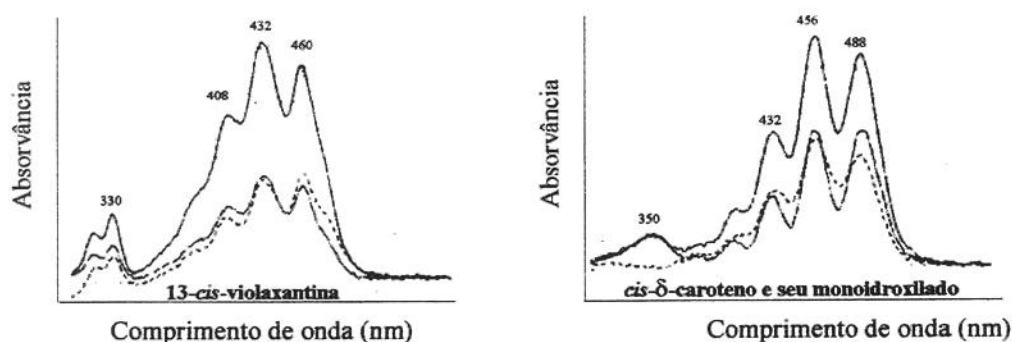
<sup>a</sup> Comprimentos de onda de absorção máxima (nm) determinado no eluente usado em CLAE e obtido pelo DAD (Coluna: Spherisorb ODS-2 (C<sub>18</sub>), 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m - Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila variando de (25:20:55) a (25:1:75) em 57 min, permanecendo nesta última proporção por mais 13 min; vazão: 0,6 ml/min); <sup>b</sup> tempo de retenção (min); <sup>c</sup> pico *cis*.

A análise de um extrato saponificado mais concentrado, empregando-se uma variação do gradiente usado, possibilitou detectar a presença de carotenóides em traço, os quais foram identificados tentativamente como 13-*cis*-violaxantina, *cis*- $\delta$ -caroteno, monoidroxilados de fitoflueno, de  $\delta$ - e  $\zeta$ -caroteno e de neurosporeno. O *cis*- $\delta$ -caroteno foi encontrado em três formas geométricas *cis* denominadas (a), (b) e (c). Os  $\lambda_{\max}$  destes pigmentos e seus tempos de retenção são apresentados na Tabela 3. Os perfis dos espectros de absorção dos monoidroxilados de fitoflueno, neurosporeno e  $\zeta$ -caroteno foram semelhantes aos espectros de seus carotenos correspondentes (Figura 2). Os perfis dos demais são apresentados na Figura 5.

**Tabela 3. Carotenóides Detectados em Traço no Extrato Saponificado de *P. venusta* por CLAE**

| Carotenóides                        | $\lambda_{\max}$                 | $t_R^b$ |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------|
| 13- <i>cis</i> -violaxantina        | 330 <sup>c</sup> , 408, 432, 460 | 9,9     |
| OH-fitoflueno                       | 346, 360, 380                    | 14,0    |
| OH-neurosporeno                     | 414, 436, 466                    | 14,3    |
| OH- $\zeta$ -caroteno               | 382, 402, 426                    | 14,7    |
| OH- $\delta$ -caroteno              | 432, 456, 488                    | 17,7    |
| <i>cis</i> - $\delta$ -caroteno (a) | 358 <sup>c</sup> , 426, 450, 480 | 25,9    |
| <i>cis</i> - $\delta$ -caroteno (b) | 352 <sup>c</sup> , 432, 454, 482 | 32,1    |
| <i>cis</i> - $\delta$ -caroteno (c) | 352 <sup>c</sup> , 432, 454, 482 | 33,4    |

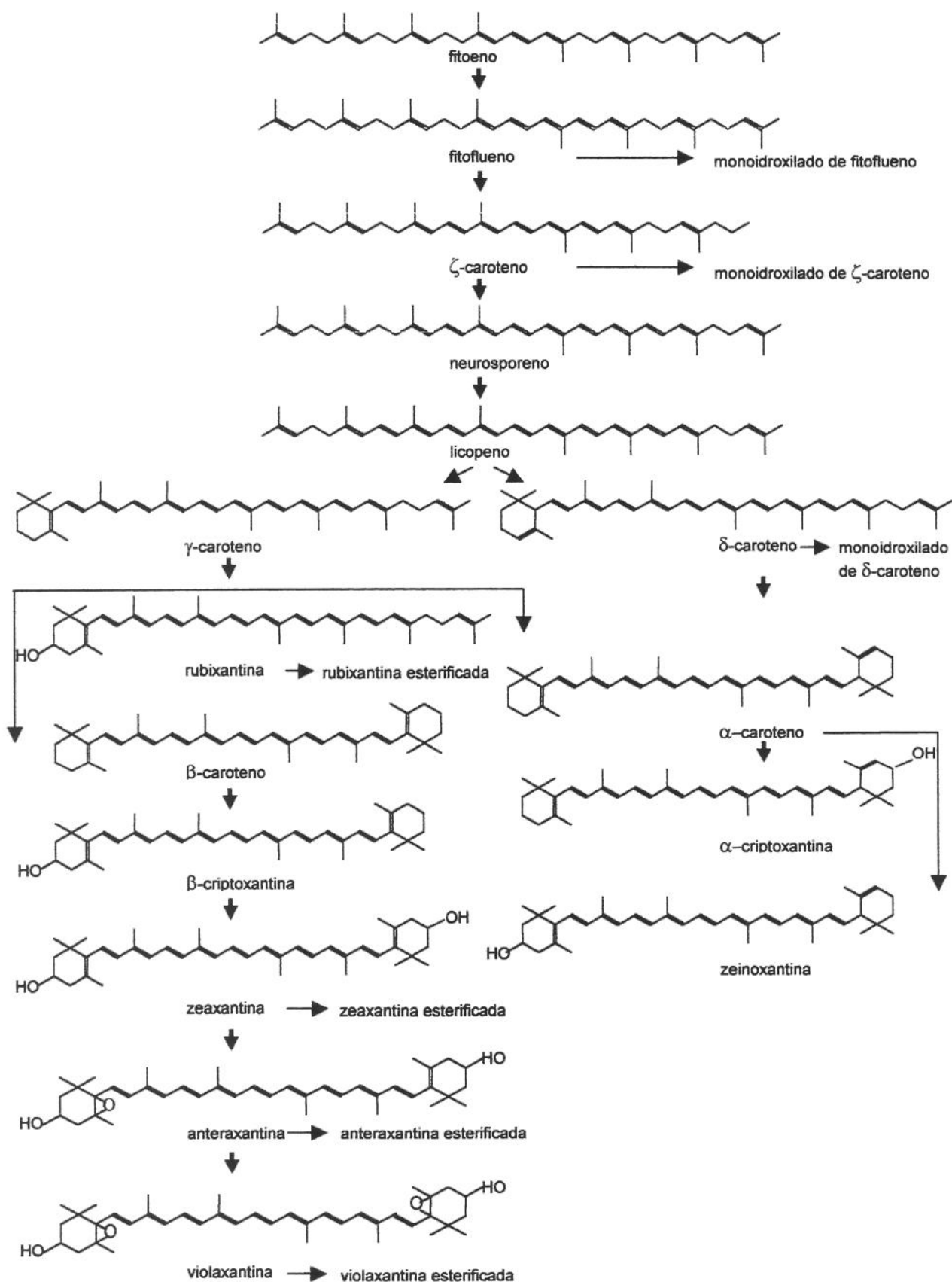
<sup>a</sup> Comprimentos de onda de absorção máxima (nm) determinado no eluente usado em CLAE e obtido pelo DAD (Coluna: Spherisorb ODS-2 (C<sub>18</sub>), 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila variando da seguinte forma: (0 min): 52:18:30; (10 min): 33:12:55; (15 min): 33:12:55; (23 min): 18:7:75; (30 min): 18:7:75; (34 min): 52:18:30; (40 min): 52:18:30); vazão: 0,6 ml/min; <sup>b</sup> tempo de retenção (min); <sup>c</sup> pico *cis*.



**Figura 5:** Espectros de absorção no visível obtidos pelo DAD. As três linhas em cada espectro indicam a medida no início (---), meio (—) e fim (---) da eluição do pigmento. Fase móvel: gradiente formado por metanol-água-acetato de etila. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 3.

A presença de vários carotenóides, alguns na mesma faixa de polaridade, dificultou as separações tanto em CCA quanto em CLAE. De forma geral, a separação de carotenos foi melhor em CCA, mas CLAE conseguiu separar melhor algumas xantofilas e possibilitou detecção de pigmentos em traços.

A Figura 6 mostra uma proposta para a biossíntese de carotenóides nas flores de *P. venusta* com base nos carotenóides identificados e à luz dos conhecimentos adquiridos ao longo de muitos anos sobre a biossíntese de carotenóides (Britton, 1989), confirmados recentemente pela clonagem dos gens de mais de 20 enzimas carotenogênicas (Hirschberg et al., 1997).



**Figura 6:** Esquema da biossíntese de carotenóides nas flores de *Pyrostegia venusta*

**Composição Quantitativa.** Devido à complexidade da composição, não foi possível a separação completa dos carotenóides em nenhuma das técnicas cromatográficas utilizadas. Embora as concentrações absolutas não tenham sido obtidas, o teor de carotenóides totais foi estimado e as porcentagens relativas dos carotenóides principais foram calculadas através das concentrações dos carotenóides isolados por CCA (Tabela 4). O valor de carotenóides totais encontrado foi elevado, 1300 µg/g de peso fresco. Deste total, a mistura de *trans*- e *cis*-rubixantina contribuiu com 31%, enquanto que a soma das porcentagens de *cis*- e *trans*-licopeno representou 13%. As porcentagens relativas de β-criptoxantina (11%) e fitoflueno (10%) ficaram próximas, assim como as de *trans*- e *cis*-ζ-caroteno (8%) e β-caroteno (7%). A soma das porcentagens de *trans*- e *cis*-zeaxantina foi igual a porcentagem de γ-caroteno (6%). Já o α-caroteno e α-criptoxantina (ou zeinoxantina) contribuíram com menos de 1% do total de carotenóides da amostra.

A estimativa da concentração de carotenóides totais no extrato bruto não saponificado (1300 µg/g) ficou abaixo do valor encontrado por Gusman e Gottsberger (1996) (1910 µg/g). Esta discrepância pode ser explicada pelo fato destes autores terem analisado apenas as pétalas das flores, enquanto que no presente trabalho foram analisadas as flores completas. As diferenças geográficas, climáticas e na eficiência da extração podem também ter influenciado.

**Tabela 4. Porcentagens Relativas dos Carotenóides Principais de Flores de *Pyrostegia venusta***

| Carotenóides                             | %          |
|------------------------------------------|------------|
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -rubixantina | 31         |
| β-criptoxantina                          | 11         |
| fitoflueno                               | 10         |
| <i>trans</i> -licopeno                   | 10         |
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -ζ-caroteno  | 8          |
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -β-caroteno  | 7          |
| γ-caroteno                               | 6          |
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -zeaxantina  | 6          |
| <i>cis</i> -licopeno                     | 3          |
| <i>cis</i> -anteraxantina                | 3          |
| <i>cis</i> -violaxantina                 | 2          |
| neurosporeno                             | 1          |
| prolicopeno                              | 1          |
| α-caroteno                               | <1         |
| poli- <i>cis</i> -rubixantina            | <1         |
| α-criptoxantina (ou zeixantina)          | <1         |
| Total (µg/g de peso fresco)              | 1300 ± 233 |

## Conclusão

As flores de *P. venusta* apresentam uma grande variedade de carotenóides, o que sugere o seu uso com fonte de extrato de corante natural, a exemplo da páprica, a qual apresenta cerca de 50 carotenóides, a maioria dos quais ainda não identificado. O teor elevado de carotenóides totais, as propriedades antioxidativas dos carotenóides isolados e a atividade pró-vitamínica de alguns deles ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e  $\gamma$ -caroteno) reforçam esta indicação. Por outro lado, esta diversidade não indica o uso destas flores como fonte de carotenóides específicos.

## Referências Bibliográficas

- Bauernfeind, J.C.; Adams, C.R.; Marusich, W.L. Carotenoids and other vitamin A precursors in animal feed. In Carotenoids as colorants and vitamin A precursors; Bauernfeind, J.C., Ed.; Academic Press: New York, 1981, pp 564.
- Bendich, A. Carotenoid and the immune system. In Carotenoids, chemistry and biology; Krinsky, N.I., Mathews-Roth, M.M., Taylor, R.F., Eds.; Plenum Press: New York, 1989, pp 323-335.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 1992, 18, 1-29.
- Britton, G. Carotenoid biosynthesis - an overview. In Carotenoids: Chemistry and biology; Krinsky, N.I., Mathews-Roth, M.M., Taylor, R.F., Eds. Plenum Press: New York, 1989, pp 167-184.
- Britton, G. UV/Visible Spectroscopy. In Carotenoids Vol 1B: Spectroscopy; Britton, G., Liaaen-Jesen, S., Pfander, H., Eds; Pergamon Press: London, 1995, pp 13-62.
- Davies, B.H. Carotenoids. In Chemistry and biochemistry of plant pigment; Goodwin, T.W., Ed., 2nd ed., vol 2; Academic Press: London, 1976, pp 38-165.
- Eugster, C.H. Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In Carotenoids: isolation and analysis, vol 1A; Britton, G., Liaaen-Jesen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhäuser Verlag Basel, 1995, pp 71-80.
- Gaziano, J.M.; Hennekens, C.H. The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993, 691, 148-155.
- Gerster, H. Pontencial role of  $\beta$ -carotene in prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1991, 61, 277-291.
- Giovannucci, E.; Ascherio, A.; Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Willett, W.C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995, 87, 1767-1776.
- Gobatto-Rodrigues, A.; Stort, M.N.S. Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) MIERS (Bignoniaceae). *Rev. Bras. Bot.* 1992, 15, 37-41.
- Gusman, A.B; Gottsberger, G. Differences in floral morphology, floral nectar constituents, carotenoids, and flavonoids in petals of orange and yellow *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae) flowers. *Phyton (Horn, Austria)* 1996, 36, 161-171.
- Hirschberg, J.; Cohen, M.; Harker, M.; Lotan, Tamar; Mann, V.; Pecker, I. Molecular genetic of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 1997, 69, 2151-



- Jacques, P.F.; Hartz, S.D.; Chylack, L.T.; McGandy, R.B.; Sadowski, J.A. Nutritional status in persons with and without senile cataract: blood vitamin and mineral levels. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988a, 48, 152-158.
- Jacques, P.F.; Chylack, L.T.; McGandy, R.B.; Hartz, S.C. Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch. Ophthalmol.* 1988b, 106, 337-340.
- Jacques, P.F.; Chylack, L.T. Jr. Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 53, 352S-355S.
- Khachik, F.; Bernstein, P.; Garland, D.L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997, 38, 1802-1811.
- King, T.J.; Khachik, F.; Bortkiewicz, H.; Fukushima, L.H.; Morioka, S.; Bertram, J.S. Metabolites of dietary carotenoids as potential cancer preventive agents. *Pure Appl. Chem.* 1997, 69, 2135-2140.
- Knekt, P.; Heliovaara, M.; Rissanen, A.; Aromaa, A.; Aaran, R.K. Serum antioxidant vitamins and risk of cataract. *Br. Med. J.* 1992, 305, 1392-1394.
- Kohlmeier, L.; Hastings, S.B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 1370S-1376S.
- Landrum, J.T.; Bone, R.A.; Sprague, K.; Moore, L. A one year study of supplementation with lutein on the macular pigment. *FASEB J.* 1997, 11, 2588.
- Leske, M.C.; Chylack, L.T.; Wu, S.-Y. The lens opacities case-control study. Risk factors to cataract. *Arch. Ophthalmol.* 1991, 109, 244-251.
- Liaaen-Jensen, S. Isolation, reactions. In *Carotenoids*; Isler, O., Ed.; Basel, Birkhauser Verlag, 1971, pp 61-188.
- Manson, J.E.; Gaziano, J.M.; Jonas, M.A.; Hennekens, C.H. Antioxidants and cardiovascular disease: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 1993, 12, 426-432.
- Mayne, S.T.; Goodwin, W.J. Jr. Chemoprevention of head and neck cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1993, 1, 126-132.
- Mayne, S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 1996, 10, 690-701.
- Quackenbush, F.W.; Miller, S.L. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1972, 55, 617-621.
- Rodriguez, D.B.; Raymundo, L.C.; Lee, T.C.; Simpson, K.L.; Chichester, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 1976, 49, 615-624.
- Sandwith, N.Y.; Hunt, D.R. Bignoniaceas. In *Flora ilustrada catarinense, Parte I*; Reitz, P.R., Ed.; Fasc. Bign. 1974, 1, 172.
- Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W. Dietary carotenoids, vitamin A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 1994, 272, 1413-1420.
- Snodderly, D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 1448S- 1461S.
- Ziegler, R.G.; Colavito, E.A.; Hartge, P.; McAdams, M.J.; Schoenberg, J.B.; Mason, T.J.; Fraumeni, J.F. JR. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 1996a, 88, 612-615.
- Ziegler, R.G.; Mayne, S.T.; Swanson, C.A. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*, 1996b, 7, 157-177.

## **CAPÍTULO 5**

### **COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DA MICROALGA *TETRASELMIS GRACILIS***

# CAROTENOID COMPOSITION OF THE MICROALGA *TETRASELMIS GRACILIS*

Marise C. de Mello, Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de  
Campinas - C. P.: 6121- CEP: 13083-970 - Campinas - SP - Brasil

Sérgio O. Lourenço and Elizabeth Barbarino

Departamento de Biologia Marinha - Universidade Federal Fluminense - C.P.: 100644 - CEP: 24011-970 -  
Niterói - RJ - Brasil

## ABSTRACT

*The carotenoid composition of the marine microalga Tetraselmis gracilis is reported for the first time. Twenty-five carotenoids were detected through chromatographic analyses by open column, thin-layer and high performance liquid chromatography. The following carotenoids were encountered:  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -carotene (trans e cis), trans- and cis-lycopene,  $\beta$ -cryptoxanthin, trans-, 9-cis- and 13-cis-lutein, zeaxanthin, antheraxanthin, trans-, 9-cis- and 13-cis-violaxanthin, trans- and cis-luteoxanthin, trans-neoxanthin, cis-neoxanthin (a), cis-neoxanthin (b), cis-neoxanthin (c), trihydroxy- $\beta$ -carotene and the ester of trihydroxy- $\beta$ -carotene. The major carotenoids were lutein (1210  $\mu\text{g/g}$  dry weight) and  $\beta$ -carotene (870  $\mu\text{g/g}$ ). The presence of many carotenoids in *T. gracilis* favour the use of the integral carotenoidic extract as a food suplement more than as a source of specific carotenoids.*

*Key words: Tetraselmis gracilis; carotenoid composition*

# COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DA MICROALGA *TETRASELMIS GRACILIS*

Marise C. de Mello, Delia B. Rodriguez-Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de  
Campinas - C. P.: 6121 - CEP: 13083-970 - Campinas - SP - Brasil

Sérgio O. Lourenço e Elizabeth Barbarino

Departamento de Biologia Marinha - Universidade Federal Fluminense - C.P.: 100644 - CEP: 24011-970 -  
Niterói - RJ - Brasil

## RESUMO

*A composição de carotenóides da microalga marinha Tetraselmis gracilis é apresentada pela primeira vez. Um total de 25 carotenóides foi detectado através das análises cromatográficas em camada delgada, coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência. Os carotenóides isolados foram  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -caroteno (trans e cis), trans- e cis-licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, trans-, 9-cis- e 13-cis-luteína, zeaxantina, anteraxantina, trans-, 9-cis- e 13-cis-violaxantina, trans- e cis-luteoxantina, trans-neoxantina, cis-neoxantina (a), cis-neoxantina (b), cis-neoxantina (c), triidroxib-caroteno e o éster de triidroxib-caroteno. Os carotenóides majoritários foram luteína (1210  $\mu\text{g/g}$  peso seco) e  $\beta$ -caroteno (870  $\mu\text{g/g}$ ). A presença de vários carotenóides na microalga T. gracilis favorece o uso de seu extrato carotenóidico integral mais como suplemento alimentar do que como fonte de carotenóides específicos.*

*Palavras chaves: Tetraselmis gracilis; composição de carotenóides*

Desde a época dos Astecas que microalgas, como a *Spirulina*, eram usadas na alimentação humana. As pesquisas iniciais com estes microrganismos visavam principalmente a produção de proteína para dieta humana e animal. Hoje a ênfase nos estudos é direcionada à ampla variedade de compostos químicos que as microalgas podem biossintetizar. Entre estes compostos estão os carotenóides, os quais são pigmentos naturais que apresentam propriedades nutricionais e antioxidativas que se somam à sua função de corante. Diversos carotenóides já foram isolados

de microalgas e sua extração a partir destes microrganismos vem se difundindo. As microalgas *Dunalliella bardawil* e *Haematococcus pluvialis*, quando cultivadas sob condições específicas, são fontes de  $\beta$ -caroteno (1) e astaxantina (2), respectivamente. Em aquacultura, os extratos de carotenóides ou a própria biomassa de microalgas, contendo astaxantina ou cantaxantina como carotenóides principais, são adicionados às rações visando acentuar a coloração de peixes como a truta e o salmão, e também de alguns crustáceos (3).

No presente trabalho, visou-se determinar a composição carotenóidica da microalga *Tetraselmis gracilis*, pertencente à classe Pleurastrophyceae (4), para avaliar o potencial de seu uso na extração de carotenóides.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material.** Foi analisada a microalga marinha *Tetraselmis gracilis*, clone CN1, obtida do Banco de Microalgas Marinhas do Laboratório de Cultivo de Microalgas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Esta espécie foi isolada de águas costeiras de Cananéia-SP. As células cresceram durante 10 dias em meio Conway original (5), sob temperatura de 21°C, aeração (2,0 l de ar/min.), ciclos de 12 h de claro/escuro ( $320 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e salinidade de 32‰. O número inicial e final de células por ml de cultivo foi de  $1,0 \times 10^4$  e  $8,98 \times 10^5$ , respectivamente. No último dia do cultivo, as células encontravam-se em fase estacionária de crescimento e foram separadas do meio de cultura através de centrifugação (16300 g/10 min a 10°C), sendo a seguir armazenadas em frascos em um freezer a cerca de -20°C até serem analisadas. Para calcular a concentração de carotenóides em base seca, a amostra foi inicialmente descongelada e homogeneizada. Volumes conhecidos foram então transferidos, lavando-se cuidadosamente o interior da pipeta com água destilada, para três placas de petri, as quais foram colocadas em estufa a temperatura entre 90 e 95°C até que a amostra secasse a peso constante.

**Extração e Saponificação.** A extração da amostra foi realizada em um almofariz com acetona resfriada e hiflosupercel, seguida por filtração a vácuo em funil sinterizado. Estes procedimentos se repetiram até que os pigmentos fossem extraídos completamente. A partição dos pigmentos para uma solução de éter de petróleo e éter etílico (3:1) foi feita em um funil de separação, adicionando pequenas porções do extrato acetônico e água destilada suficiente para promover a transferência dos pigmentos para a fase etérea. Ao final da partição, o extrato etéreo



total foi lavado cinco vezes com água para remover completamente a acetona e o resíduo de água retirado através da adição de sulfato de sódio anidro. Na saponificação foi usada uma solução metanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. Esta reação ocorreu na presença de BHT (0,01% do volume do extrato), no escuro e à temperatura ambiente por aproximadamente 13 h. O extrato foi então lavado com água até a total eliminação do álcali.

***Cromatografia em Coluna Aberta (CCA).*** Os extratos etéreos não saponificados foram concentrados sob vácuo em um evaporador rotatório à temperatura máxima de 35°C. Para separar os pigmentos foi usada uma coluna de vidro com 2,5 cm de diâmetro e 28 cm de comprimento, empacotada sob vácuo com uma mistura de MgO:hiflosupercel (1:2) até uma altura de aproximadamente 12 cm. Antes que a amostra fosse aplicada, adicionou-se sulfato de sódio anidro no topo da coluna, para remover qualquer resíduo de água no extrato, e a coluna foi acondicionada com éter de petróleo. Os pigmentos foram separados com éter de petróleo, concentrações crescentes de éter etílico e acetona em éter de petróleo, acetona pura e concentração crescente de água em acetona. As bandas formadas por mais de um carotenóide foram recromatografadas em colunas de MgO:hiflosupercel (1:1) ou de alumina neutra (óxido de alumínio neutro) atividade I.

***Espectrofotometria de Absorção no UV/Visível.*** Os espectros de absorção dos pigmentos foram obtidos em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640) no intervalo de 300 a 600 nm e os comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) foram comparados com os tabelados por Davies (6) e Britton (7).

***Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE).*** Os extratos saponificados e não saponificados foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de 35°C e secos sob uma corrente suave de nitrogênio. Os pigmentos foram então redissolvidos em acetona grau CLAE, filtrados em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (Millipore) e injetados em um cromatógrafo a líquido (Varian, modelo 9010) através de um injetor (Rheodyne) com alça de amostragem de 10  $\mu\text{l}$ . Usando um detector por arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 994), os cromatogramas foram monitorados a 450 nm e os espectros obtidos na faixa de 300 a 600 nm. Uma coluna de fase reversa Licrospher 100 RP-18, com partículas de 5  $\mu\text{m}$  e dimensões de 250 mm x 4 mm (Merck), foi utilizada para separar os pigmentos. O gradiente utilizado era formado por metanol-água-acetato de etila nas seguintes proporções ao longo do tempo: (0 min)- 56:19:25, (10 min)- 49:16:35, (20 min)- 41:14:45,

(25 min)-37:13:50, (30 min)- 37:13:50, (35 min)- 34:11:55, (40 min)- 30:10:60, (45 min)- 22:8:70, e (50 min)- 22:8:70. O tempo de re-equilíbrio entre duas análises consecutivas foi de 10 min e a vazão usada foi de 0,6 ml/min.

**Identificação.** A identificação dos carotenóides baseou-se na associação das informações obtidas do (a) comportamento em CCA, em cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel desenvolvida com 5% de metanol em tolueno e em CLAE, (b) espectros de absorção no UV-visível e (c) reação químicas específicas. Foram realizadas as reações de metilação e rearranjo epóxido-furanóxido (de 5,6 para 5,8 epóxido) (8). A configuração *cis* ou *trans* dos carotenóides foi determinada pela reação de fotoisomerização catalisada por iodo. No caso de *trans*-carotenóides, esta reação provoca um deslocamento para  $\lambda_{\max}$  mais baixos (efeito hipsocrômico), enquanto que para *cis*-carotenóides ocorre o inverso (efeito batocrômico) ou não há mudança nos valores de  $\lambda_{\max}$ .

**Quantificação.** Os pigmentos isolados por CCA foram quantificados por espectrofotometria segundo a Lei de Beer. Os coeficientes de absorção ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) usados foram os tabelados por Davies [6] e Britton [7] ou calculados segundo o primeiro autor. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de carotenóides/g de peso seco.

## RESULTADOS

**Composição qualitativa.** Os 25 carotenóides encontrados na microalga *T. gracilis* foram caracterizados (Tabela 1) e seus espectros de absorção obtidos por DAD ou espectrofotômetro estão apresentados na Figura 1.

Entre os carotenóides isolados por CCA (Fig. 2), os carotenos *trans*- e *cis*- $\gamma$ -caroteno, *trans*- e *cis*-licopeno e *trans*- $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno foram identificados segundo seus espectros de absorção característicos, ordem de eluição na coluna de MgO:hiflosupercel e valores de  $R_f$  em camada delgada de sílica gel. Embora a reação de fotoisomerização tenha indicado a forma *trans* para  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, a presença de um pico *cis* a 331 e 334 nm, respectivamente (Tabela 1), revelou que estas frações continham as formas *trans* e *cis*, com predominância da primeira.

**Tabela 1.** Características dos carotenóides de *T. gracilis* detectados por CCA e/ou CLAE

| Carotenóide                               | $\lambda_{\text{máx}}^a$ (CCA)     | $R_f^b$ | Reações Químicas             | $\lambda_{\text{máx}}^c$ (CLAE)    | $t_R^d$ (min) |
|-------------------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|------------------------------------|---------------|
| <i>cis</i> -neoxantina (a)                | -----                              | ----    | -----                        | 336 <sup>e</sup> , 418, 442, 472   | 7,1           |
| <i>cis</i> -neoxantina (b)                | -----                              | ----    | -----                        | 328 <sup>e</sup> , 408, 432, 462   | 8,4           |
| neoxantina                                | -----                              | ----    | -----                        | 420, 444, 474                      | 8,7           |
| <i>cis</i> -neoxantina (c)                | 327 <sup>e</sup> , 412, 435, 464   | 0,00    | <i>cis</i> +, ep.+           | 328 <sup>e</sup> , 414, 438, 466   | 9,2           |
| triidroxi- $\beta$ -caroteno              | -----                              | ----    | -----                        | (426), 448, 476                    | 9,2           |
| violaxantina <sup>f</sup>                 | 327 <sup>e</sup> , 415, 438, 468   | 0,06    | <i>trans</i> +, ep.+         | 418, 442, 472                      | 11,1          |
| luteoxantina                              | 399, 421, 447                      | 0,05    | <i>trans</i> +, ep.+         | 400, 424, 450                      | 11,9          |
| 9- <i>cis</i> -violaxantina               | -----                              | ----    | -----                        | 328 <sup>e</sup> , 414, 438, 466   | 12,6          |
| <i>cis</i> -luteoxantina                  | 397, 419, 446                      | 0,06    | <i>cis</i> +, ep.+           | 314 <sup>e</sup> , 394, 418, 444   | 13,1          |
| 13- <i>cis</i> -violaxantina              | 327 <sup>e</sup> , 414, 437, 466   | 0,06    | <i>cis</i> +, ep.+           | 330 <sup>e</sup> , 410, 434, 464   | 13,7          |
| anteraxantina                             | 418, 440, 469                      | 0,08    | <i>trans</i> +, ep.*+        | 424, 448, 476                      | 14,2          |
| luteína                                   | 420, 441, 469                      | 0,15    | <i>trans</i> +, ep.*-, met.+ | 426, 447, 476                      | 17,4          |
| 9- <i>cis</i> -luteína                    | -----                              | ----    | -----                        | 332 <sup>e</sup> , 420, 444, 470   | 19,0          |
| 13- <i>cis</i> -luteína                   | 416, 436, 464                      | 0,15    | <i>cis</i> +, ep.*-, met.+   | 332 <sup>e</sup> , 418, 442, 468   | 20,0          |
| zeaxantina                                | -----                              | ----    | -----                        | (432), 454, 482 <sup>g</sup>       | -----         |
| monoéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno | -----                              | ----    | -----                        | (426), 448, 476                    | 22,3          |
| $\beta$ -criptoxantina                    | -----                              | ----    | -----                        | (426), 448, 476                    | 30,7          |
| <i>cis</i> -licopeno                      | 439, 465, 496                      | 0,97    | <i>cis</i> +                 | 440, 467, 498                      | 41,5          |
| licopeno                                  | 443, 470, 502                      | 0,99    | <i>trans</i> +               | 446, 476, 508                      | 42,1          |
| <i>cis</i> - $\gamma$ -caroteno           | 343 <sup>e</sup> , 427, 452, 482   | 0,98    | <i>cis</i> +                 | 434, 457, 488 <sup>g</sup>         | -----         |
| $\gamma$ -caroteno                        | 433, 457, 486                      | 0,98    | <i>trans</i> +               | 440, 464, 496                      | 42,6          |
| $\alpha$ -caroteno <sup>f</sup>           | 331 <sup>e</sup> , 419, 442, 471   | 0,99    | <i>trans</i> +               | 426, 447, 476                      | 43,1          |
| $\beta$ -caroteno <sup>f</sup>            | 334 <sup>e</sup> , (426), 446, 472 | 0,99    | <i>trans</i> +               | (432), 454, 482                    | 43,5          |
| <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno            | -----                              | ----    | -----                        | 340 <sup>e</sup> , (426), 448, 476 | 44,4          |

<sup>a</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtidos por espectrofotômetro, referentes às bandas (em éter de petróleo) separadas por CCA; <sup>b</sup> valores obtidos em placa de sílica gel desenvolvida com 5% metanol/tolueno; <sup>c</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtido pelo DAD, referentes aos picos da análise de CLAE (Fig. 4) - fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila; <sup>d</sup> tempo de retenção dos picos da Fig. 4; <sup>e</sup> pico *cis*; <sup>f</sup> presença de pico *cis* nos valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  do carotenóide separado por CCA, mas a reação de fotoisomerização indicou presença majoritária da forma *trans*; <sup>g</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm) obtido em gradiente diferente; ( ) - indica ombro no lugar de pico; met. - metilação; ep. - epóxido (reação com vapores de HCl concentrado e rearranjo epóxido-furanóxido), ep.\* epóxido (apenas reação com vapores de HCl concentrado).

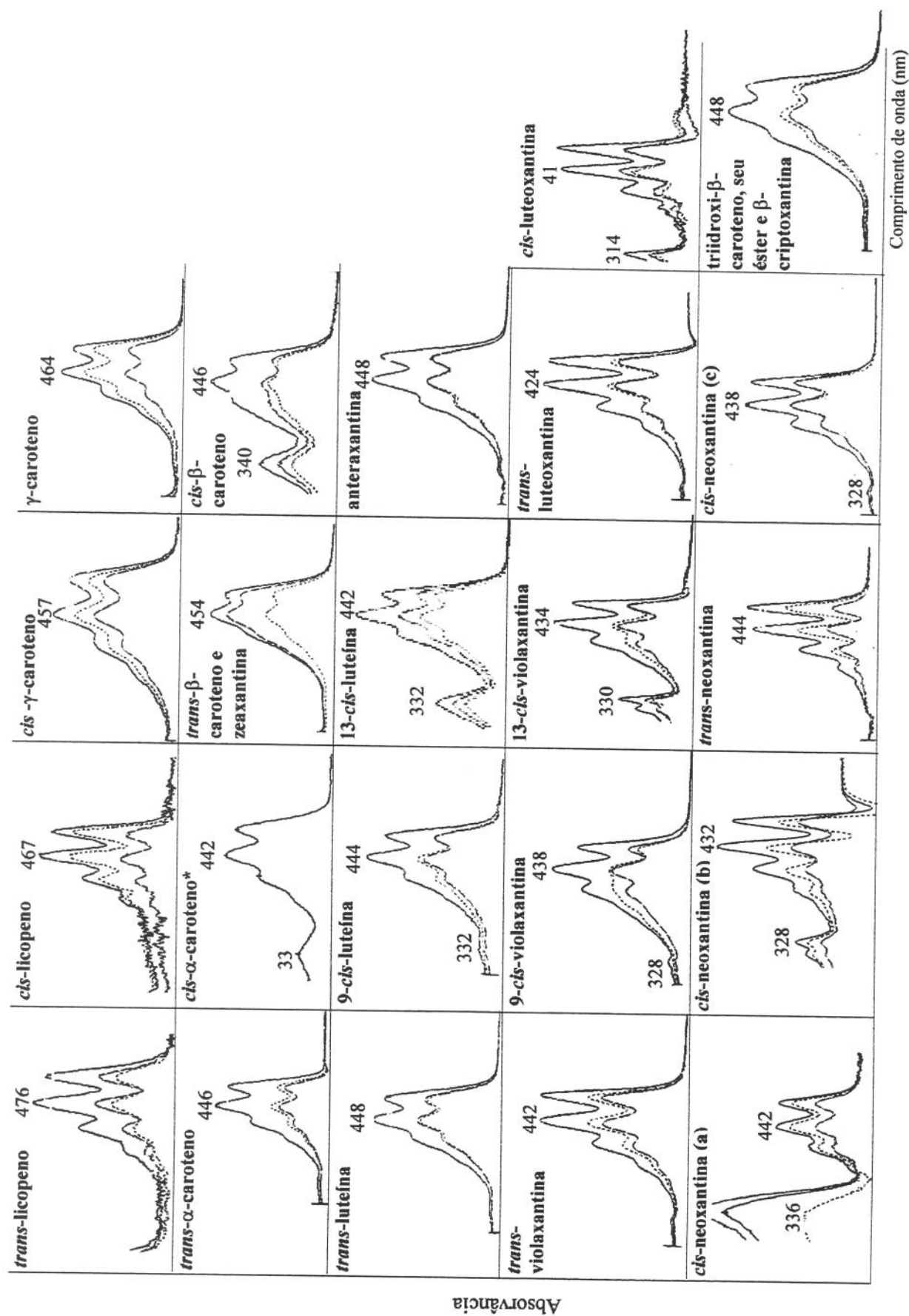
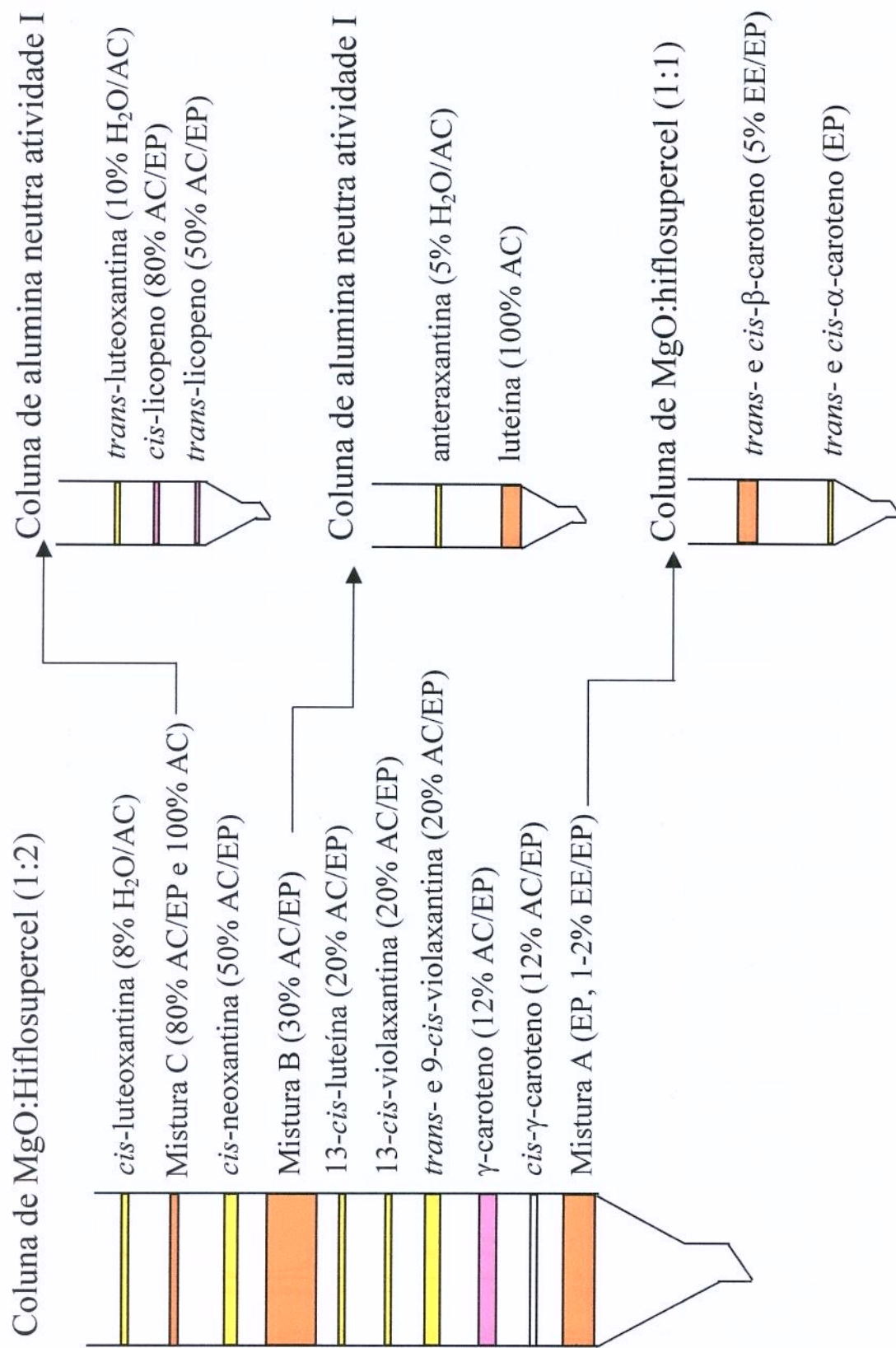


FIG. 1. Espectros de absorção dos carotenóides de *Tetraselmis gracilis* obtidos pelo DAD. As três linhas em cada espectro indicam a medida no início (—), meio (---) e fim (···) dos picos da Fig. 4. Fase móvel: gradiente formado por metanol-água-acetato de etila. \*espectro de absorção obtido em espectrofômetro e em éter de petróleo.

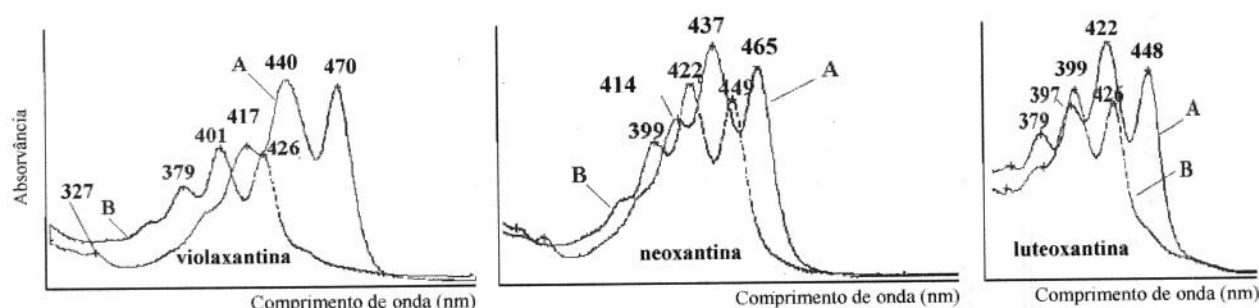


**FIG. 2.** Separação dos carotenóides de *Tetraselmis gracilis* por CCA. EP- éter de petróleo; EE- éter etílico; AC- acetona.



Entre as xantofilas isoladas em CCA, a fração correspondente a luteína, o carotenóide majoritário da amostra, apresentou  $R_f$  típico de um diidroxilado e resposta positiva à reação de metilação, confirmando a posição alílica de um dos dois grupos hidroxílicos da luteína. A forma *cis*-luteína (Fig. 2) foi especulativamente identificada como sendo 13-*cis* com base na diferença de 5 nm entre o seu  $\lambda_{max}$  e o da forma *trans* (9). A detecção de um pico *cis* de intensidade alta na região do UV confirmaria esta identificação, porém isto não foi possível devido a presença de um interferente nesta região.

Na identificação das frações de *trans*- e *cis*-violaxantina, *trans*- e *cis*-luteoxantina, *cis*-neoxantina e anteraxantina, a presença de grupos epóxidos foi indicada inicialmente pela mudança da cor destes pigmentos para azul ou verde ao serem expostos a vapores de HCl concentrado. A posição de grupos 5,6-, 5',6-' ou 5,6- e 5',6'-epóxidos nas moléculas destes pigmentos foi verificada através do rearranjo epóxido-furanóxido de 5,6- para 5,8-epóxido, que ocorre após adição de algumas gotas de HCl 0,1N à solução etanólica do pigmento. Com esta mudança, foi observado um efeito hipsocrômico de aproximadamente 40 nm nos  $\lambda_{max}$  da violaxantina e de 20 nm nos  $\lambda_{max}$  da luteoxantina e neoxantina (Fig. 3). Este resultado indica que a violaxantina apresenta dois grupos 5,6-epóxido, enquanto luteoxantina e neoxantina apenas um. A luteoxantina apresenta também um grupo 5,8-epóxido em sua molécula. A presença deste grupo faz com que seus  $\lambda_{max}$  sejam cerca de 20 nm abaixo dos  $\lambda_{max}$  do  $\beta$ -caroteno. Os  $\lambda_{max}$  obtidos para violaxantina, em éter de petróleo, ficaram um pouco abaixo dos tabelados por Davis (6) e Britton (7), porém foi detectado um pico *cis* de intensidade baixa a 327 nm (Fig. 3), indicando a presença da forma *cis*, além da forma majoritária *trans* (Tabela 1). De acordo com a intensidade do pico *cis*, é provável que a violaxantina esteja misturada com seu isômero 9-*cis*-. A posição do grupo 5,6-epóxido da anteraxantina não foi caracterizada devido à baixa concentração deste pigmento.



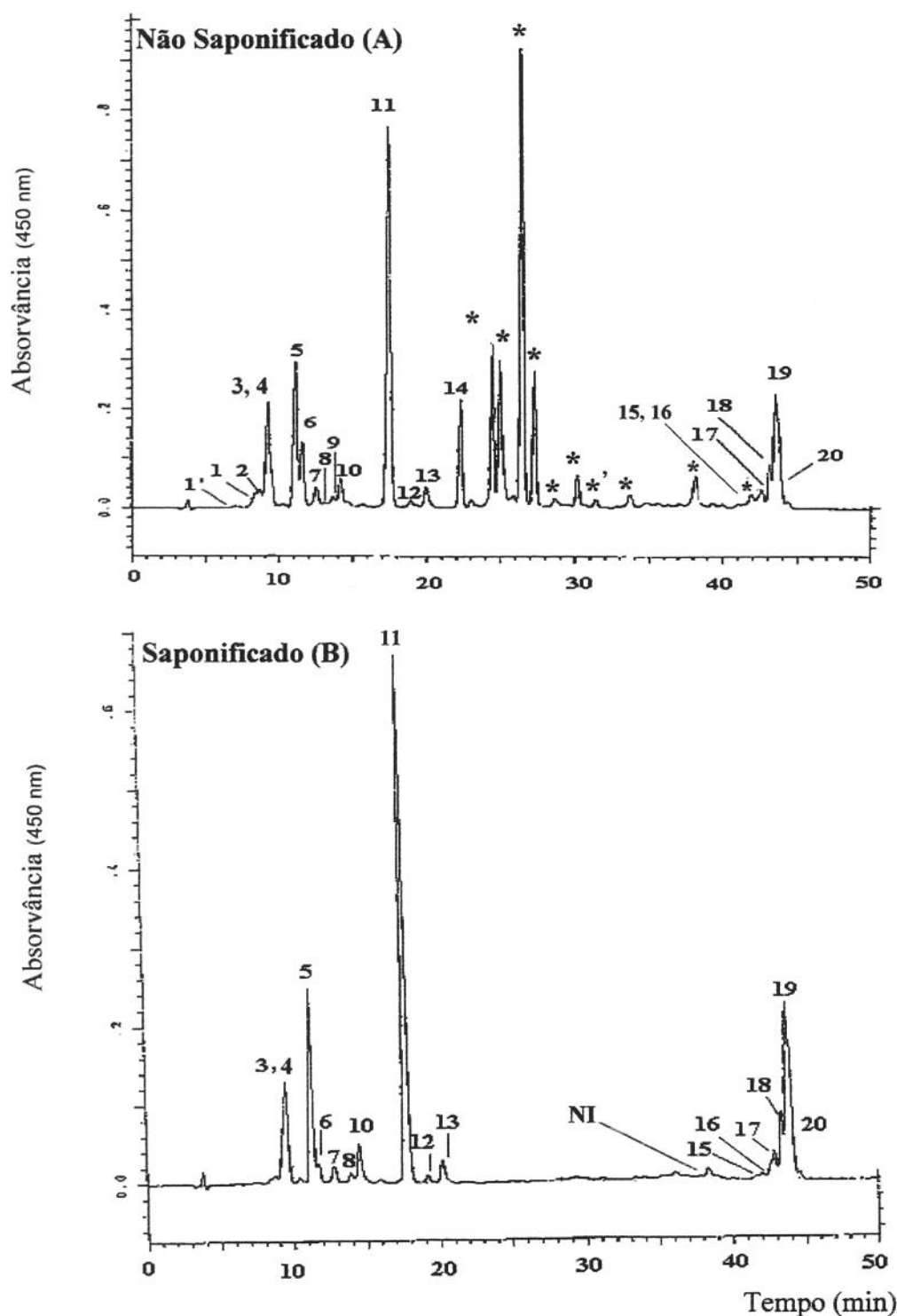
**FIG 3.** Espectros de absorção, obtido em espectrofotômetro, da violaxantina, neoxantina e luteoxantina em solução de etanol 95% (A) e após adição de gotas de HCl 0,1N (B).

Em CLAE os carotenóides foram identificados através de seus tempos de retenção (Tabela 1) e espectros de absorção obtidos pelo DAD (Fig. 1). Todos os carotenóides isolados em CCA foram também detectados por CLAE. Por outro lado, a identificação de  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e triidroxi- $\beta$ -caroteno em *T. gracilis* só foi possível quando as frações isoladas por CCA foram analisadas por CLAE (Tabela 1). A  $\beta$ -criptoxantina foi identificada na banda onde eluiu o  $\gamma$ -caroteno, a zeaxantina logo após a banda de luteína e o triidroxi- $\beta$ -caroteno na fração mais polar. Estes três pigmentos apresentaram tempos de retenção típicos de mono, di e triidroxi-carotenóides, respectivamente, perfis de espectro de absorção semelhante ao do  $\beta$ -caroteno (Fig. 1) e estavam presentes em baixas concentrações. O triidroxi- $\beta$ -caroteno e a zeaxantina foram mascarados nas análises pelo fato de apresentarem polaridades semelhantes a da neoxantina e da luteína, respectivamente e estarem presentes em concentrações bem menores que estes dois pigmentos. A presença de vários picos de clorofila no cromatograma do extrato não saponificado (Fig. 4A) dificultou a detecção de  $\beta$ -criptoxantina.

O pico 14 (Fig. 4) foi identificado como éster pelo fato de ter sido detectado apenas na amostra não saponificada (Fig. 4A). De acordo com sua ordem de eluição, trata-se provavelmente de um monóéster de um triidroxi-carotenóide. Este éster foi identificado como monóéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno, pois enquanto na amostra saponificada predominava o espectro do pico 3 (*cis*-neoxantina (c) - Fig. 1), após a saponificação, o DAD passou a registrar o espectro do pico 4 (triidroxi- $\beta$ -caroteno - Fig. 1), o qual foi semelhante ao do éster. Como esperado, o pico do monóéster desapareceu com a saponificação, mas a área referente a sua forma livre (Fig. 4, pico 4) não aumentou proporcionalmente. Este resultado pode ser explicado pela perda de xantofilas muito polares no processo de saponificação, principalmente durante a partição dos pigmentos para éter de petróleo.

Os perfis de espectros e os valores  $\lambda_{\max}$  de  $\beta$ -criptoxantina e triidroxi- $\beta$ -caroteno livre e esterificado foram semelhantes ao do *cis*- $\beta$ -caroteno. Isto sugere que estes carotenóides possam estar presentes na forma *cis*; entretanto não foi observada a presença de pico *cis* na região do UV.

A coluna e o gradiente usados em CLAE foram eficientes na separação de isômeros. A luteína e a violaxantina foram detectadas nas formas *trans*, 9-*cis* e 13-*cis*, a neoxantina nas formas *trans*, *cis* (a), *cis* (b) e *cis* (c) e a luteoxantina nas formas *trans* e *cis*. A identificação dos 9- e 13-*cis*-isômeros foi baseada em dois critérios (Mercadante et al. (10)): 1- o isômero cujo  $\lambda_{\max}$  é mais próximo ao do isômero *trans* seria o 9-*cis* e o mais distante o 13-*cis*; 2- o espectro do isômero 13-*cis* deve



**FIG 4.** Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificado e saponificado de *Tetraselmis gracilis*. 1'- *cis*-neoxantina (a), 1- *cis*-neoxantina (b), 2- *trans*-neoxantina, 3- *cis*-neoxantina (c), 4- triidroxi- $\beta$ -caroteno; 5- *trans*-violaxantina, 6- *trans*-luteoxantina, 7- 13-*cis*-violaxantina, 8- *cis*-luteoxantina, 9- 9-*cis*-violaxantina, 10- anteraxantina, 11- *trans*-luteína, 12- 9-*cis*-luteína, 13- 13-*cis*-luteína, 14- monoéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno, 15- *cis*-licopeno, 16- licopeno, 17-  $\gamma$ -caroteno, 18-  $\alpha$ -caroteno, 19-  $\beta$ -caroteno, 20- *cis*- $\beta$ -caroteno; \* clorofilas; \*' clorofila +  $\beta$ -criptoxantina; NI- não identificado ( $\lambda_{\max}$ : (432), 454, 480 nm) . Coluna: Licrospher 100 RP-18, 250 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila.

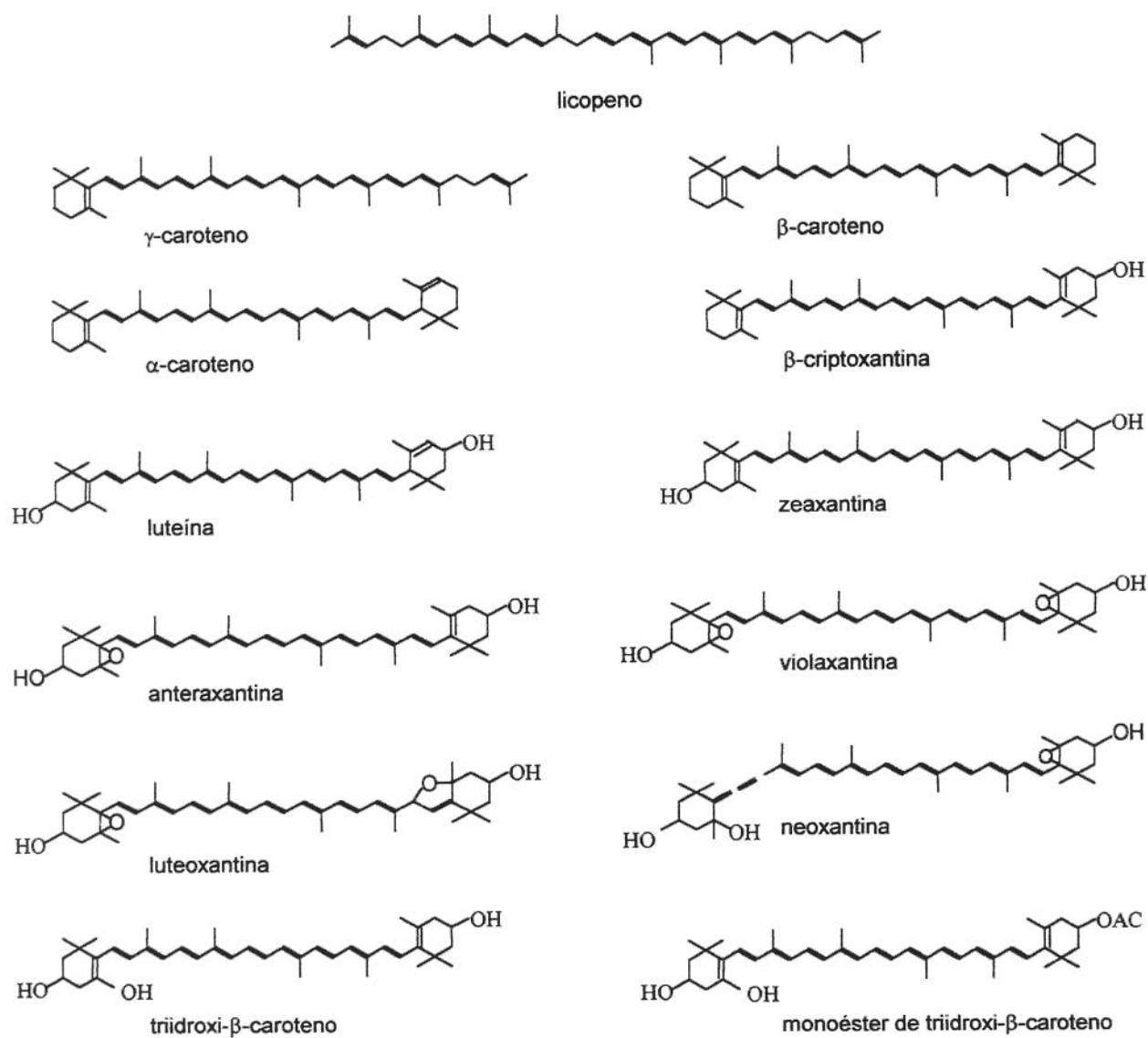
apresentar um pico intenso na região do UV, enquanto que no isômero 9-*cis* o pico *cis* está ausente ou apresenta intensidade baixa.

Além dos carotenóides mostrados na Tabela 1, traços de outros carotenóides foram detectados na análise por CLAE, mas não foram identificados devido à baixa concentração dos mesmos. A Fig. 5 mostra as estruturas dos carotenóides encontrados em *T. gracilis*.

**Composição Quantitativa.** A Tabela 2 mostra as concentrações dos carotenóides isolados do extrato não saponificado da microalga *T. gracilis*, usando a técnica de CCA. A luteína (1210 µg/g de peso seco) e β-caroteno (870 µg/g) foram os carotenóides mais abundantes, correspondendo a 33 e 24%, respectivamente, do total de carotenóides encontrado. As quantidades obtidas para *cis*-neoxantina (500 µg/g) e violaxantina (540 µg/g, *trans* + *cis*) foram também expressivas. As porcentagens relativas dos demais pigmentos foram de 7,6% para γ-caroteno (*trans* + *cis*), 3,8% para α-caroteno e de 3,2% para luteoxantina. Já as concentrações de anteraxantina e de licopeno (*trans* + *cis*) representaram menos de 1% do total.

**Tabela 2.** Concentração e porcentagem relativa dos carotenóides isolados por CCA do extrato não saponificado de *T. gracilis*

| Carotenóides                            | µg/g<br>(base seca) | %    |
|-----------------------------------------|---------------------|------|
| <i>trans</i> -luteína                   | 1130                | 30,4 |
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -β-caroteno | 870                 | 23,5 |
| <i>cis</i> -neoxantina                  | 500                 | 13,5 |
| <i>trans</i> -violaxantina              | 410                 | 11,1 |
| <i>trans</i> -γ-caroteno                | 240                 | 6,5  |
| <i>trans</i> - e <i>cis</i> -α-caroteno | 140                 | 3,8  |
| 13- <i>cis</i> -violaxantina            | 130                 | 3,5  |
| <i>trans</i> -luteoxantina              | 120                 | 3,2  |
| 13- <i>cis</i> -luteína                 | 80                  | 2,2  |
| <i>cis</i> -γ-caroteno                  | 40                  | 1,1  |
| <i>trans</i> -anteraxantina             | 20                  | 0,5  |
| <i>cis</i> -licopeno                    | 20                  | 0,5  |
| <i>trans</i> -licopeno                  | 10                  | 0,3  |
| Total                                   | 3710                |      |



**FIG 5.** Estruturas dos carotenóides encontrados em *Tetraselmis gracilis*.



## DISCUSSÃO

O gênero *Tetraselmis* geralmente é incluído na classe Prasinophyceae, entretanto ainda existem controvérsias sobre esta classificação e a de outros gêneros desta classe. A composição de carotenóide nas Prasinophyceae pode variar principalmente em relação ao pigmento majoritário, o qual pode ser luteína, prasinoxantina ou sinfonoxantina. As espécies que apresentam luteína (como carotenóide principal), violaxantina e neoxantina, foram inseridas na classe denominada por Raven (4) de Pleurastrophyceae. Seguindo este critério, o gênero *Tetraselmis* foi transferido para esta nova classe.

Até o momento, a classe Pleurastrophyceae é composta por poucas espécies e dados quantitativos sobre seus carotenóides são raros. Entre os carotenóides isolados desta classe encontram-se o licopeno,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -caroteno, equinenona,  $\alpha$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Com exceção de equinenona e de  $\alpha$ -criptoxantina, os demais carotenóides foram também encontrados na espécie *T. gracilis*. Entretanto, a equinenona e a  $\alpha$ -criptoxantina foram isoladas apenas nas espécies *Tetraselmis suecica* (12) e *Microthamnion kuetzingianum* (11), respectivamente. Em *T. gracilis* é possível afirmar que estes pigmentos estão ausentes ou presentes em traços, pois não foram detectados picos nos tempos de retenção esperado para a eluição dos mesmos no cromatograma do extrato saponificado (Fig. 4B), onde não ocorre interferência dos picos de clorofilas que poderia tê-las mascarados.

A análise de *T. gracilis* acrescentou os carotenóides luteoxantina e os pigmentos identificados tentativamente como triidroxi- $\beta$ -caroteno e o monoéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno à classe Pleurastrophyceae. Wright e Shearer (12), estudando um extrato de carotenóides não saponificado da microalga *T. suecica*, também identificaram tentativamente triidroxi- $\alpha$ -caroteno ( $\lambda_{\max}$  (420), 444, 472) e citaram a presença de um carotenóide não identificado ( $\lambda_{\max}$  422, 448, 476). Estes pigmentos provavelmente correspondem ao triidroxi- $\beta$ -caroteno e ao monoéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno, respectivamente, encontrados também no extrato não saponificado de *T. gracilis*. Como no presente trabalho, o triidroxi- $\alpha$ -caroteno identificado por Wright e Shearer (12) eluiu praticamente junto ao pico da *cis*-neoxantina e o carotenóide não identificado, após o pico da luteína. Além disto, os valores de  $\lambda_{\max}$  do pigmento não identificado foi praticamente semelhante aos encontrados para o monoéster de triidroxi- $\beta$ -caroteno ( $\lambda_{\max}$  (426), 448, 476).

A presença considerável de luteína e  $\beta$ -caroteno em *T. gracilis* indica seu potencial como fonte de extração destes carotenóides. Entretanto, a composição carotenóidica complexa desta microalga é um obstáculo no isolamento destes pigmentos, mas, por outro lado, favorece a comercialização do extrato carotenóidico integral como um suplemento mais completo. A importância cada vez maior de  $\beta$ -caroteno e luteína deve-se ao fato de ambos apresentarem boas propriedades antioxidativas (18) e o primeiro ser o precursor principal de vitamina A. Além disto, a luteína está envolvida com a prevenção da degeneração macular (19).

O interesse na comercialização de luteína a partir de microalgas é ainda reduzido diante dos baixos custos da sua produção a partir de flores de *Tagetes erecta* (3). Entretanto, as microalgas podem ganhar um maior potencial comercial com o desenvolvimento de novas linhagens e tecnologias, a exemplo da microalga *Dunaliella*, onde condições de cultivos foram estudadas e implementadas para a produção de  $\beta$ -caroteno.

1. Ben-Amotz, A.; Katz, A.; Avron, M. (1982). Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 18: 529-537.
2. Renström, B.; Borch, G.; Skulberg, O.M.; Liaaen-Jensen, S. (1981). Optical purity of (3*S*, 3*S'*)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry*, 20: 2561-2564.
3. Borowitzka, M.A. (1993). Product from microalgae. *Infotish Int.*, 5: 21-26.
4. Raven, J.A. (1987). Biochemistry, biophysics and physiology of chlorophyll b - containing algae: implications for taxonomy and phylogeny. *Prog. Phycol. Res.*, 5 : 1-121.
5. Walne, P. R. (1966). Experiments in large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fish. Invest.*, London, (ser 2) 25: 53.
6. Davies, B.H. (1976). Carotenoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigment* (Goodwin, T.W., ed.). Academic Press, London, p. 38-163.
7. Britton, G. (1995). Uv/visible spectroscopy. In *Carotenoids: Spectroscopy Vol 1B* (Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, p. 13-63.
8. Eugster, C.H. (1995). Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In *Carotenoids: isolation and analysis, vol 1A* (Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, p. 71-80.
9. Britton, G. (1991). Carotenoids. *Methods Plant Biochem.*, 7: 473-518.
10. Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Britton, G. (1997). HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 120-123.
11. Weber, A.; Czygan, F.C. (1972). Chlorophylls and carotenoids of Chaetophorineae (Chlorophyceae, Ulotrichales). 1. Siphonaxanthin in *Microthamnion kuetzingianum*

13. Ricketts, T.R. (1970). The pigments of the prasinophyceae and related organisms. *Phytochemistry*, 9: 1835-1842.
14. Kjoesen, H.; Arpin, N.; Liaaen-Jensen, S. (1972). Algal carotenoids. 6. Carotenoids of *Trentepohlia-ololithus*- isolation of beta, beta-carotene-2-ol, beta, epsilon-carotene-2-ol and beta,beta-carotene-2,2'-diol. *Acta Chem. Scand.*, 26: 3053-3067.
15. Buchecker, R.; Eugster, C.H.; Kjoesen, H.; Liaaen-Jensen, S. (1973). Absolute configuration of beta, epsilon-caroten-2-ol, beta, beta-caroten-2-ol and beta,beta-caroten-2,2'-diol. *Helv. Chim. Acta*, 56: 2899-2901.
16. Nybraaten, G.; Liaaen-Jesen, S. (1974). Algal carotenoids.12. Chemical-reactions of carotenoids with 2-hydroxylated beta-rings. *Acta Chem. Scand.*, 28: 485-488.
17. Nybraaten, G.; Liaaen-Jesen, S. (1974). Algal carotenoids. 11. New carotenoids epoxides from *Trentepohlia-ololithus*. *Acta Chem. Scand.*, 28: 483-485.
18. Bauernfeind, J.C.; Adams, C.R.; Marusich, W.L. (1981). Carotenoids and other vitamin A precursors in animal feed. In *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors* (Bauernfeind, J.C., ed.). Academic Press, New York, p. 563-743.
19. Seddon, J.M.; Ajani, U.A.; Sperduto, R.D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T.C.; Farber, M.D.; Gragoudas, E.S.; Haller, J.; Miller, D.T.; Yannuzzi, L.A.; Willett, W. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.*, 272: 1413-1420.



## **CAPÍTULO 6**

### **DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES NAS MICROALGAS *SYNECHOCOCCUS SUBSALSUS* E *HILLEA* SP**





# Determination of the Carotenoid Composition of the Microalgae *Synechococcus subsalsus* and *Hillea* sp

Marise C. de Mello<sup>1</sup>, Sérgio O. Lourenço<sup>2</sup>, Elizabeth Barbarino<sup>2</sup> and Delia B. Rodriguez-Amaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas - C. P. 6121- CEP: 13083-970 - Campinas - SP, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Marinha - Universidade Federal Fluminense, C. P. 100644 - CEP: 24011-970 - Niterói - RJ, Brasil.

---

**Key Words** - *Synechococcus subsalsus*; *Hillea* sp; carotenoid composition.

**Abstract** - The carotenoids of the marine microalgae *Synechococcus subsalsus* and *Hillea* sp were isolated by open column chromatography and their identification complemented by thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography with a photodiode-array detector.  $\beta$ -carotene (850  $\mu\text{g/g}$  dry weight) and zeaxanthin (800  $\mu\text{g/g}$ ) were the major carotenoids in *S. subsalsus*, while alloxanthin (2660  $\mu\text{g/g}$ ) predominated in *Hillea* sp. Much smaller amounts of echinenone,  $\beta$ -cryptoxanthin and 3-hydroxy- $\beta$ -caroten-4'-one were detected in *S. subsalsus*, while in *Hillea* sp the minor carotenoids were  $\zeta$ -carotene,  $\epsilon$ -carotene,  $\alpha$ -carotene (*trans* and *cis*), *cis*- $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, crocoxanthin, monadoxanthin and an unidentified ketocarotenoid. This is the first report of the carotenoid composition of *S. subsalsus* and *Hillea* sp microalgae.

# Determinação da Composição de Carotenóides nas Microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Hillea* sp

Marise C. de Mello<sup>1</sup>, Sérgio O. Lourenço<sup>2</sup>, Elizabeth Barbarino<sup>2</sup> e Delia B. Rodriguez-Amaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas - C. P. 6121- CEP: 13083-970 - Campinas - SP, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Marinha - Universidade Federal Fluminense, C. P. 100644 - CEP: 24011-970 - Niterói - RJ, Brasil.

---

**Palavras Chaves** - *Synechococcus subsalsus*; *Hillea* sp; composição de carotenóides.

**Resumo** - A composição de carotenóides de duas espécies de microalgas marinhas, *Synechococcus subsalsus* e *Hillea* sp, é apresentada pela primeira vez. Os carotenóides foram isolados por cromatografia em coluna aberta e sua identificação complementada por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de arranjo de diodos. Em *S. subsalsus* o  $\beta$ -caroteno (850  $\mu\text{g/g}$  peso seco) e a zeaxantina (800  $\mu\text{g/g}$ ) foram os carotenóides majoritários, enquanto que em *Hillea* sp houve predominância de aloxantina (2660  $\mu\text{g/g}$ ). Os demais carotenóides detectados em *S. subsalsus* (equinenona,  $\beta$ -criptoxantina e 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4') e em *Hillea* sp ( $\zeta$ -caroteno,  $\epsilon$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno (*trans* e *cis*), *cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, crocoxantina, monadoxantina e um cetocarotenóide não identificado) estavam presentes em quantidades bem menores.

## Introdução

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na Natureza, que podem ser encontrados em fungos, bactérias, animais, em todos os tecidos fotossintéticos de plantas e em alguns tecidos não fotossintéticos como frutas, flores, sementes e raízes [1].

O uso cada vez maior de carotenóides deve-se principalmente às suas propriedades fisiológicas e nutricionais, às quais se somam a sua função como corante. Além de alguns carotenóides serem precursores de vitamina A [2], estes pigmentos podem auxiliar no fortalecimento do sistema imunológico [3], na prevenção de doenças cardiovasculares [4, 5, 6, 7], catarata [8, 9, 10, 11, 12], degeneração macular [13, 14, 15, 16] e alguns tipos de câncer [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23].

Os carotenóides estão também presentes em microalgas marinhas e já existem em diferentes partes do mundo indústrias para produção destes microrganismos, por exemplo em Taiwan (*Chlorella*), Tailândia (*Spirulina*), Estados Unidos (*Spirulina* e *Dunaliella*), Austrália (*Dunaliella* e *Chlorella*), Israel (*Dunaliella*) e México (*Spirulina*) [24]. As microalgas mais importantes como fonte de carotenóides são *Dunaliella bardawil* e *Haematococcus pluvialis*. A primeira, quando cultivada sob luz de alta intensidade e deficiência de nitrogênio, produz cerca de 9% de  $\beta$ -caroteno em relação ao seu peso seco [25]. A segunda, quando cultivada sob deficiência de nitrogênio, apresenta 76% do total de carotenóides constituído por monoésteres de astaxantina [26].

Como a composição carotenóidica de muitas microalgas marinhas ainda não é conhecida, no presente trabalho foram selecionadas duas espécies isoladas no litoral brasileiro, *Hillea* sp e *Synechococcus subsalsus*, para serem estudadas. Estas microalgas pertencem às classes Cryptophyceae e Cyanophyceae, respectivamente. Nas Cryptophyceae, a aloxantina é considerada o carotenóide quimiotaxonômico e ocorre a predominância de  $\alpha$ -caroteno no lugar de  $\beta$ -caroteno, o qual é o caroteno principal na maioria das demais classes. A presença de outros carotenóides acetilênicos, como crocoxantina e monadoxantina, é outra característica particular deste grupo de microalgas [27].

As Cyanophyceae caracterizam-se pela presença de 2-(2')-*trans*-hidroxilas em xantofilas bicíclicas 3-(3')-hidroxiladas, abundância de xantofilas acíclicas, monocíclicas, glicosídicas e bicíclicas cetônicas [27, 28, 29, 30]. A  $\beta$ -caroteno, mixoxantofilas, equinenona e zeaxantina são os carotenóides mais freqüentes e abundantes nas Cyanophyceae [31].

No presente trabalho determinou-se a composição carotenóidica das microalgas *Hillea* sp e *Synechococcus subsalsus* com o objetivo de avaliar o potencial das mesmas na extração de carotenóides.

## Experimental

**Material.** Foram analisadas as microalgas marinhas *Hillea* sp, clone PB1, e *Synechococcus subsalsus*, clone UB2, obtidas do Banco de Microalgas Marinhas do Laboratório de Cultivo de Microalgas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Estas espécies foram isoladas de águas costeiras de João Pessoa-PB e Ubatuba-SP, respectivamente. As células cresceram em meio Conway original [32] por 9 (*S. subsalsus*) e 11 (*Hillea* sp) dias, sob temperatura de 21°C, aeração (2,0 l de ar/min), ciclos de 12 h de claro/escuro ( $320 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e salinidade de 32‰. O número inicial e final de células por ml de cultivo para *Hillea* sp foi de  $3,5 \times 10^4$  e  $1,95 \times 10^6$  e para *S. subsalsus* foi de  $5 \times 10^5$  e  $7,95 \times 10^7$ , respectivamente. No último dia do cultivo as células encontravam-se em fase estacionária de crescimento e foram separadas do meio de cultura através de centrifugação (16300 g/10 min a 10°C), sendo a seguir armazenadas em frascos em um freezer a cerca de -20°C até serem analisadas. Para calcular a concentração de carotenóides em base seca, a amostra foi inicialmente descongelada e homogeneizada. Volumes conhecidos foram então transferidos, lavando-se cuidadosamente o interior da pipeta com água destilada, para três placas de petri, as quais foram colocadas em estufa a temperatura entre 90 e 95°C até que a amostra secasse a peso constante.

**Extração.** A extração da amostra foi realizada em um almofariz com acetona resfriada e hiflosupercel, seguida por filtração a vácuo em funil sinterizado. Estes procedimentos se repetiram até que os pigmentos fossem extraídos completamente. A partição dos pigmentos para uma solução de éter de petróleo e éter etílico (3:1) foi feita em um funil de separação, adicionando pequenas porções do extrato acetônico e água destilada suficiente para promover a transferência dos pigmentos para a fase etérea. Ao final da partição, o extrato etéreo total foi lavado cinco vezes com água para remover completamente a acetona e o resíduo de água retirado através da adição de sulfato de sódio anidro.

**Saponificação.** A saponificação foi realizada usando-se uma solução metanólica de 10% KOH (p/v), na proporção de 1:1 em relação ao volume do extrato. Esta reação ocorreu na presença de



BHT (0,01% do volume do extrato), no escuro e à temperatura ambiente por aproximadamente 13 h. O extrato foi então lavado com água até a total eliminação do álcali.

**Técnicas cromatográficas.** Para as análises cromatográficas, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de 35°C.

**Cromatografia de coluna aberta (CCA).** a separação dos pigmentos foi conduzida em uma coluna de vidro empacotada à vácuo com uma mistura de MgO:hiflosupercel (1:1) e desenvolvida com éter de petróleo, concentrações crescentes de éter etílico e acetona em éter de petróleo, e, quando necessário, acetona pura e concentração crescente de água em acetona.

**Cromatografia de camada delgada (CCD).** As frações isoladas em CCA foram aplicadas em placas de sílica gel, que foi desenvolvida com 5% de metanol em tolueno.

**Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).** O extrato concentrado foi seco totalmente sob uma corrente suave de nitrogênio e redissolvido em acetona. A seguir, foi filtrado em membrana de 0,45 µm de porosidade (Millipore) e injetado em um cromatógrafo a líquido (Varian, modelo 9010), munido de um injetor Rheodyne com alça de amostragem de 10 µl e um detector de arranjo de diodo (DAD) (Waters, modelo 994). Os espectros de cada pico foram obtidos dentro do intervalo de 300 a 600 nm e os cromatogramas monitorados a 450 nm. Uma coluna de fase reversa Licrospher 100 RP-18, com partículas de 5 µm e dimensões de 250 mm x 4 mm (Merck), foi utilizada para separar os carotenóides. O gradiente utilizado era formado por metanol, água e acetato de etila nas seguintes proporções ao longo do tempo: (0 min)- 60:20:20, (10 min)- 52:18:30, (15 min)- 49:16:35, (25 min)- 49:16:35, (35 min)- 41:14:45, (40 min)- 41:14:45, (45 min)- 37:13:50, (50 min)- 34:11:55, (58 min)- 30:10:60, (68 min)- 22:8:70; (72 min)- 19:6:75 e (80 min)- 19:6:75. O tempo de re-equilíbrio foi 10 min e a vazão utilizada foi de 0,6 ml/min.

**Espectro de absorção no UV-visível.** As frações foram lidas em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640), no intervalo de comprimento de onda de 300 a 600 nm e seus valores de  $\lambda_{\max}$  comparados com os tabelados por Davies [33] e Britton [34].

**Espectrometria de massas.** Esta técnica foi usada na identificação de aloxantina, monadoxantina e crocoxantina. As frações isoladas foram dissolvidas em metanol e 2 gotas de ácido fórmico 1% (v/v) foram adicionadas. A seguir, foram filtradas em membranas com 0,45 µm de porosidade (Millipore, JBR610245) e injetadas em um espectrômetro de massas (Micromass, modelo Platform II) através da técnica de ionização por electrospray. A diferença de

potencial aplicado ao capilar foi de 3500 V, o nitrogênio foi usado como gás secante a 70°C e o espectro de massas foi adquirido no modo de íons positivos com picos centróides em uma faixa de massa de  $m/z$  de 450 a 700 com 2 s/scan.

**Identificação.** A identificação das frações baseou-se no (A) comportamento em CCA, CCD e CLAE, (B) espectros de absorção no visível e (C) reações químicas específicas [35].

**Quantificação.** Os pigmentos isolados por CCA foram quantificados por espectrofotometria segundo a Lei de Beer. Os coeficientes de absorção usados ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) foram os tabelados por Davies [33] e Britton [34] ou calculados segundo o primeiro autor. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de carotenóides/g de material seco.

## Resultados e Discussão

### *Carotenóides da Microalga Hillea sp*

Associando-se os resultados das análises de cromatografia em coluna aberta (CCA), camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram detectados 12 carotenóides na microalga *Hillea sp* (Tabela 1). Os espectros de absorção na região do visível (em éter de petróleo), obtidos por espectrofotômetro, são apresentados na Figura 1 e suas estruturas na Figura 2.

Os carotenos isolados por CCA (Figura 3) foram  $\zeta$ - e  $\epsilon$ -caroteno e  $\alpha$ - caroteno (*trans* e *cis*) e *cis*- $\beta$ -caroteno. A identificação destes carotenos baseou-se em valores de  $R_f$ , comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e perfis de espectros característicos. O  $\epsilon$ -caroteno, por exemplo, apresentou  $\lambda_{\text{max}}$  baixos e espectro com três máximos de absorção bem definidos. Estas características são compatíveis com a presença de um cromóforo de 9 ligações duplas conjugadas em cadeia linear em sua molécula.

A presença do pico *cis* nos espectros de *cis*- $\alpha$ - e *cis*- $\beta$ -caroteno não foi confirmada devido a um interferente na região do UV. Entretanto, a configuração *cis* foi determinada pela reação de fotoisomerização, a qual não provocou mudanças nos  $\lambda_{\text{max}}$  destes pigmentos (Figura 1).

O  $\zeta$ -caroteno eluiu junto com o final da fração de *cis*- $\beta$ -caroteno e não foi visualizado por estar presente em concentração muito baixa, o espectro desta mistura foi determinado e apresentou  $\lambda_{\text{max}}$  de 377, 398, 421 nm para o  $\zeta$ -caroteno.

A presença de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno já havia sido constatada na maioria das espécies de Cryptophyceae [36, 37, 38, 39, 40, 41, 42], mas até o momento não foi registrada a presença de  $\zeta$ -caroteno e apenas *Cryptomonas ovata* var. *palustris* apresentou  $\epsilon$ -caroteno [36, 42].

As xantofilas isoladas por CCA foram um cetocarotenóide não identificado,  $\beta$ -criptoxantina, crocoxantina, monadoxantina e aloxantina.

**TABELA 1.** CARACTERÍSTICAS DOS CAROTENÓIDES DETECTADOS POR CCA E CLAE NA MICROALGA *HILLEA* SP.

| Carotenóides                    | $\lambda_{\text{máx}}$ <sup>a</sup> (CCA) | R <sub>f</sub> <sup>b</sup> | Reações Químicas                 | $\lambda_{\text{máx}}$ <sup>c</sup> (CLAE) | t <sub>R</sub> <sup>d</sup> |
|---------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| aloxantina                      | (429), 448, 477                           | 0,15                        | <i>trans</i> +, ep-, met-, acet+ | (432), 454, 484                            | 21,1                        |
| monadoxantina                   | 422, 443, 473                             | 0,19                        | <i>trans</i> +, ep-, met+, acet+ | 426, 450, 480                              | 22,0                        |
| <i>cis</i> -aloxantina (a)      | -----                                     | -----                       | -----                            | 348 <sup>e</sup> , 428, 448, 478           | 23,3                        |
| <i>cis</i> -aloxantina (b)      | -----                                     | -----                       | -----                            | 346 <sup>e</sup> , (426), 448, 476         | 24,7                        |
| crocoxantina                    | 421, 443, 473                             | 0,55                        | <i>trans</i> +, ep-, met-, acet+ | 428, 448, 478                              | 42,8                        |
| $\beta$ -criptoxantina          | (424), 445, 472                           | 0,55                        | <i>trans</i> +, ep-, met-, acet+ | -----                                      | -----                       |
| cetocarotenóide <sup>f</sup>    | 371 <sup>e</sup> , 478                    | 0,93                        | <i>trans</i> +, ep-, red+        | -----                                      | -----                       |
| $\zeta$ -caroteno               | 377, 398, 421                             | 0,98                        | -----                            | 380, 402, 426                              | 51,9                        |
| <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno  | (421), 442, 467                           | 0,98                        | <i>cis</i> +                     | 426, 450, 480                              | 54,0                        |
| $\epsilon$ -caroteno            | 413, 436, 466                             | 0,98                        | <i>trans</i> +                   | 420, 442, 474                              | 60,4                        |
| $\alpha$ -caroteno <sup>f</sup> | 327 <sup>e</sup> , 419, 442, 471          | 0,99                        | <i>trans</i> +                   | 426, 448, 478                              | 60,9                        |
| <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno | 416, 438, 466                             | 0,98                        | <i>cis</i> +                     | 334 <sup>e</sup> , 420, 442, 472           | 61,7                        |

<sup>a</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtidos por espectrofotômetro, referentes às bandas (em éter de petróleo) separadas por CCA; <sup>b</sup> valores obtidos em placa de sílica gel desenvolvida com 5% metanol/tolueno; <sup>c</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtido por DAD, referentes aos picos da análise de CLAE (Figura 4). Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila; <sup>d</sup> tempo de retenção dos picos da Figura 4; <sup>e</sup> pico *cis*; <sup>f</sup> presença de pico *cis* nos valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  do carotenóide isolado por CCA, mas a reação de fotoisomerização indicou presença majoritária da forma *trans*; ( ) – indica ombro no lugar de pico; met – metilação; ep – epóxido (reação com vapores de HCl concentrado); acet – acetilação; red – redução.

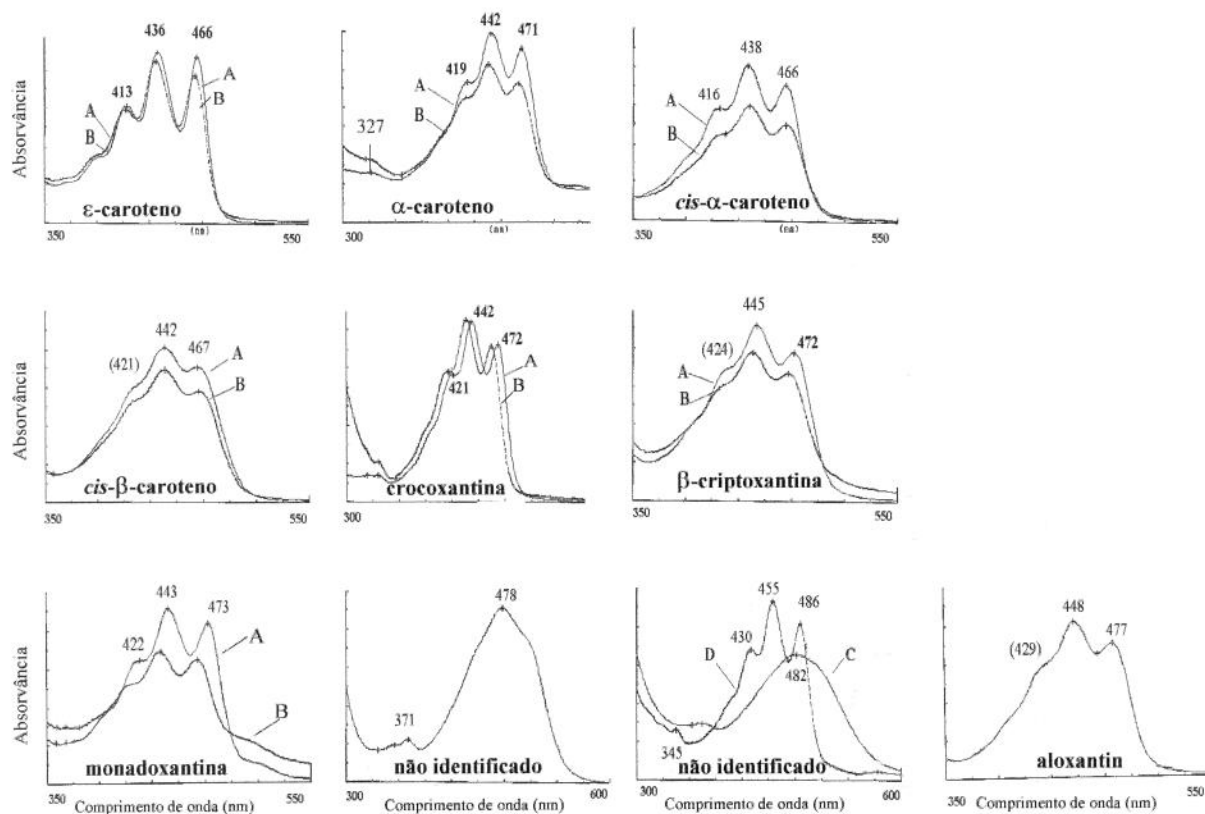
A crocoxantina apresentou espectro de absorção semelhante ao do  $\alpha$ -caroteno e R<sub>f</sub> característico de um monoidroxilado. A presença de um grupo hidroxílico em sua molécula foi confirmada pela resposta positiva à reação de acetilação, enquanto que a posição não alílica deste grupo à ligação dupla foi indicada pela reação negativa à metilação. Entretanto, com estes mesmo dados, esta fração poderia também ter sido identificada como zeinoxantina. Para definir a identificação desta fração, foi realizada uma análise por espectrometria de massas. O espectro de massas mostrou um íon molecular a *m/z* 550, que correspondente ao peso molecular da crocoxantina e que difere de duas unidades a menos do peso da zeinoxantina. Esta diferença é

coerente com a presença de um grupo acetilênico na molécula da crocoxantina. Adicionalmente, a presença de crocoxantina é típica em microalgas da classe Cryptophyceae [36, 37, 38, 39], enquanto a zeinoxantina ainda não foi identificada nas espécies já estudadas.

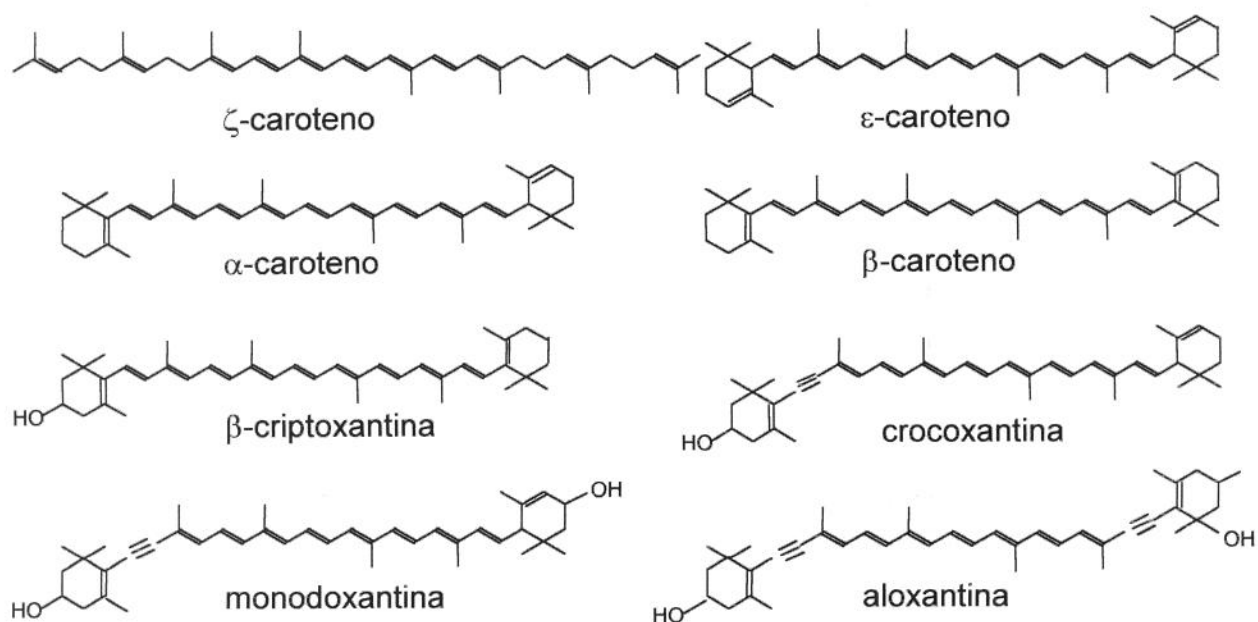
As frações identificadas como monadoxantina e aloxantina poderiam, através de seus  $R_f$ ,  $\lambda_{\max}$  e reações químicas específicas, ter sido identificadas também como luteína e zeaxantina, respectivamente (Tabela 1). Entretanto, a análise destas frações por espectrometria de massas gerou íons moleculares a  $m/z$  566 e a  $m/z$  564, que correspondem ao peso molecular da monadoxantina e da aloxantina, respectivamente. As diferenças de 2 e 4 unidades a menos, em relação ao peso molecular da luteína e zeaxantina, concordam com a presença de um e de dois grupos acetilênicos nas moléculas da monadoxantina e aloxantina, respectivamente. Além do mais, a aloxantina é o carotenóide majoritário de todas as espécies da classe Cryptophyceae e a presença da monadoxantina foi detectada na maioria delas [36, 37, 40].

A  $\beta$ -criptoxantina foi identificada através de seu espectro de absorção idêntico ao do  $\beta$ -caroteno, valor de  $R_f$  típico de um monoidroxilado, resposta positiva à acetilação, que comprovou a presença de hidroxila, e reação negativa à metilação, indicando que o grupo hidroxílico não se encontrava em posição alílica em relação à ligação dupla. A presença deste carotenóide na classe Cryptophyceae ainda não havia sido relatada.

O pigmento identificado como cetocarotenóide apresentou valor de  $R_f$  um pouco menor que o esperado para um caroteno (Tabela 1) e perfil de espectro com baixa definição (espectro formado por um único pico largo com  $\lambda_{\max}$  a 478 nm, Figura 1). Estas características indicaram a presença de um grupo carbonílico em sua molécula, e portanto foi submetido à redução com boridreto de sódio. Após a redução, seu espectro de absorção passou a apresentar três  $\lambda_{\max}$  definidos (430, 455 e 486 nm e pico *cis* a 345 nm) e perfil semelhante ao de um carotenóide monocíclico. Com estas características o carotenóide reduzido assemelhou-se ao  $\delta$ -caroteno ( $\lambda_{\max}$  431, 456 e 489 nm, em éter de petróleo [33]). Estes dados sugerem que o cetocarotenóide possa ser um derivado carbonílico deste caroteno. Embora a reação de fotoisomerização tenha indicado a forma *trans*, a presença de um pico *cis* a 371 nm (Figura 1) revelou que este pigmento continha as formas *trans* (predominante) e *cis*.

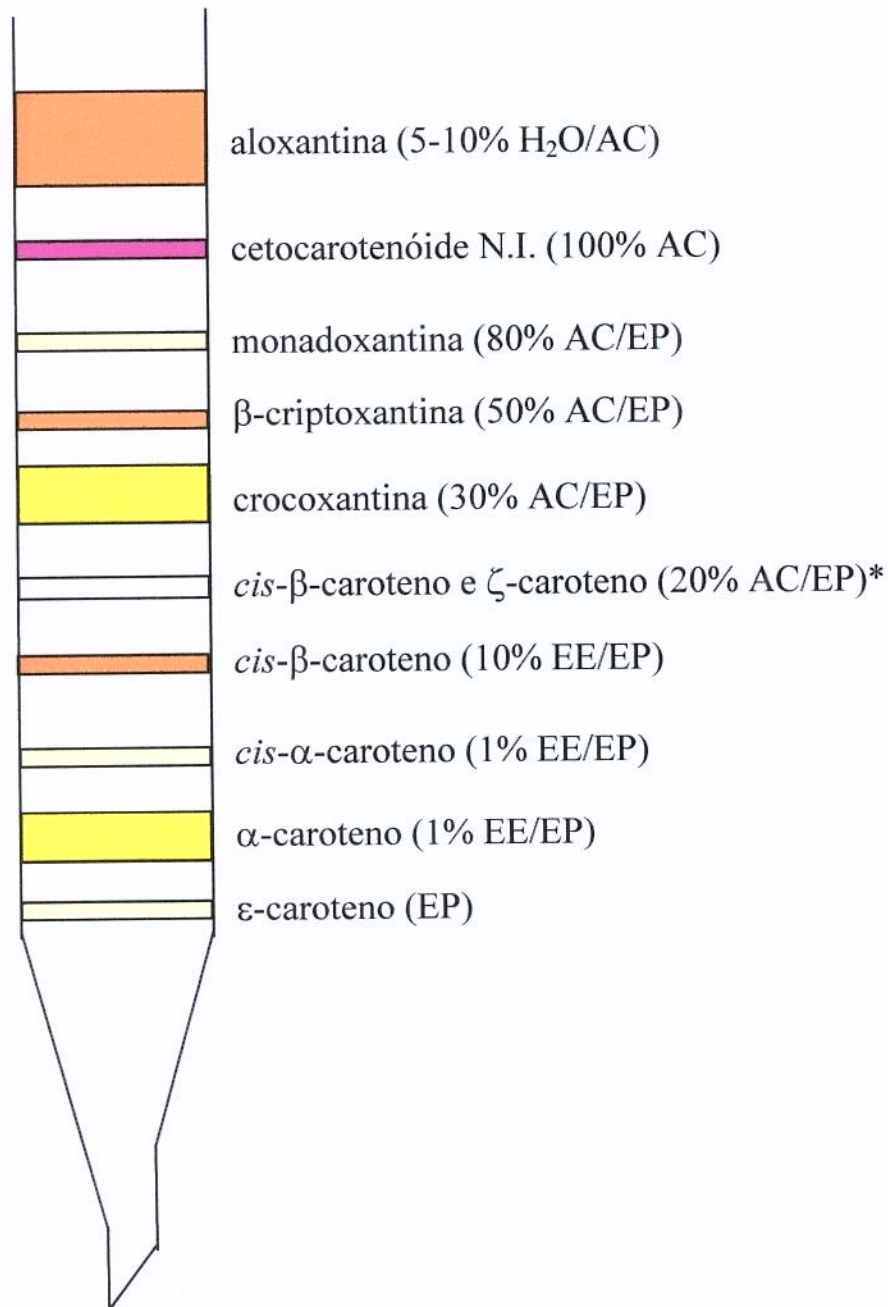


**Figura 1.** Espectros de absorção no UV-visível (em éter de petróleo), obtidos por espectrofotômetro, dos carotenóides da microalga *Hillea* sp isolados por CCA. (A) antes e (B) após reação de fotoisomerização; (C) em etanol 95% e (D) após reação de redução com  $\text{NaHB}_4$ .



**Figura 2.** Estruturas dos carotenóides encontrados na microalga *Hillea* sp.

## Coluna de MgO:Hiflosupercel (1:1)

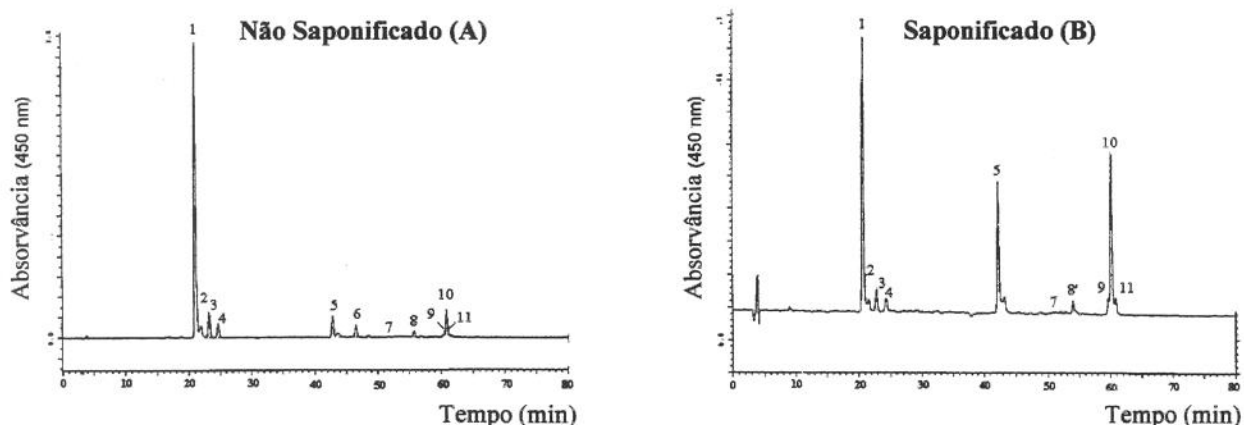


**Figura 3.** Separação dos carotenóides da microalga *Hillea* sp por CCA. EE- éter etílico, EP- éter de petróleo; AC- acetona, N.I.- não identificado; \* fração não visualizada.



Com exceção de  $\alpha$ -caroteno, crocoxantina, monodoxantina e aloxantina, os demais pigmentos só foram isolados por CCA quando amostras muito concentradas foram analisadas.

Em CLAE os pigmentos foram identificados através de seus tempos de retenção,  $\lambda_{\text{max}}$  e perfis de espectros de absorção (Tabela 1). A comparação de extratos saponificados e não saponificados revelou a ausência de carotenóides esterificados (Figura 4A e B). O perfil cromatográfico do extrato não saponificado mostrou que a composição carotenoídica de *Hillea* sp é constituída praticamente de aloxantina (Figura 4A). No cromatograma do extrato saponificado, a altura do pico da aloxantina assemelhou-se às das obtidas para crocoxantina e  $\alpha$ -caroteno (Figura 4B) devido à sua perda durante a saponificação. Além da forma *trans*, a aloxantina, foi detectada também na configuração *cis*-(a) e *cis*-(b). Os carotenóides  $\zeta$ - e *cis*- $\beta$ -caroteno eluíram separados em CLAE (Figura 4- picos 7 e 8'), enquanto que a  $\beta$ -criptoxantina e o cetocarotenóide não foram detectados devido à baixa concentração do extrato e destes pigmentos na amostra.



**Figura 4.** Cromatogramas, obtidos por CLAE, do extrato não saponificado e saponificado de *Hillea* sp. 1- aloxantina, 2- monodoxantina, 3- *cis*-aloxantina (a), 4- *cis*-aloxantina (b), 5- crocoxantina, 6- clorofila, 7-  $\zeta$ -caroteno, 8- clorofila, 8'- *cis*- $\beta$ -caroteno, 9-  $\epsilon$ -caroteno, 10-  $\alpha$ -caroteno e 11- *cis*- $\alpha$ -caroteno. Coluna: Licrospher 100 RP-18, 250 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila.

## ***Carotenóides da Microalga Synechococcus subsalsus***

Um total de 10 carotenóides foi encontrado na microalga *S. subsalsus* (Tabela 2). Os espectros de absorção no visível destes pigmentos (em éter de petróleo), obtido por espectrofotômetro, são apresentados na Figura 5 e suas estruturas na Figura 6.

Os carotenóides isolados em CCA (Figura 7) foram *trans*- e *cis*- $\beta$ -caroteno, equinenona,  $\beta$ -criptoxantina, 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4' e zeaxantina.

O  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina foram identificados da mesma forma descrita para suas caracterizações na microalga *Hillea* sp. O  $\beta$ -caroteno foi o único caroteno detectado e a presença de um pico *cis* a 337 nm em seu espectro de absorção (Figura 5) mostrou que este pigmento era constituído por uma mistura das formas *trans* e *cis*, com predominância da primeira.

A fração identificada como equinenona apresentou  $R_f$  um pouco abaixo do obtido para o  $\beta$ -caroteno e perfil de espectro de absorção com baixa definição, consistindo de um único pico a 452 nm e um ombro a 475 nm (Figura 5). Ao ser submetida à reação de redução com boridreto de sódio, seu espectro passou a ser semelhante ao do  $\beta$ -caroteno com  $\lambda_{max}$  a (429), 449, 474 nm (Figura 5). Quando o carotenóide reduzido foi submetido à reação de metilação, ficou comprovado que seu grupo hidroxílico encontrava-se em posição alílica. Com exceção de seus  $\lambda_{max}$  terem ficado aproximadamente 6 nm abaixo dos tabelados por Davies [33] (458, (482) nm), os demais dados reforçam a identificação desta fração como equinenona.

A fração identificada tentativamente como 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4' apresentou espectro de absorção típico de um cetocarotenóide e  $R_f$  compatível com a presença de um grupo carbonílico e hidroxílico. A confirmação do grupo carbonílico foi feita como descrito para equinenona. A reação de redução deste grupo provocou mudanças em seu espectro, o qual passou a apresentar perfil semelhante ao do  $\beta$ -caroteno e  $\lambda_{max}$  a (429), 450, 478 nm. A resposta negativa à reação de metilação indicou que seu grupo hidroxílico não se encontrava em posição alílica em relação à ligação dupla. Com estas informações, e considerando que o grupo OH esteja no carbono 3, a posição mais provável do grupo carbonílico seria no carbono 4'.

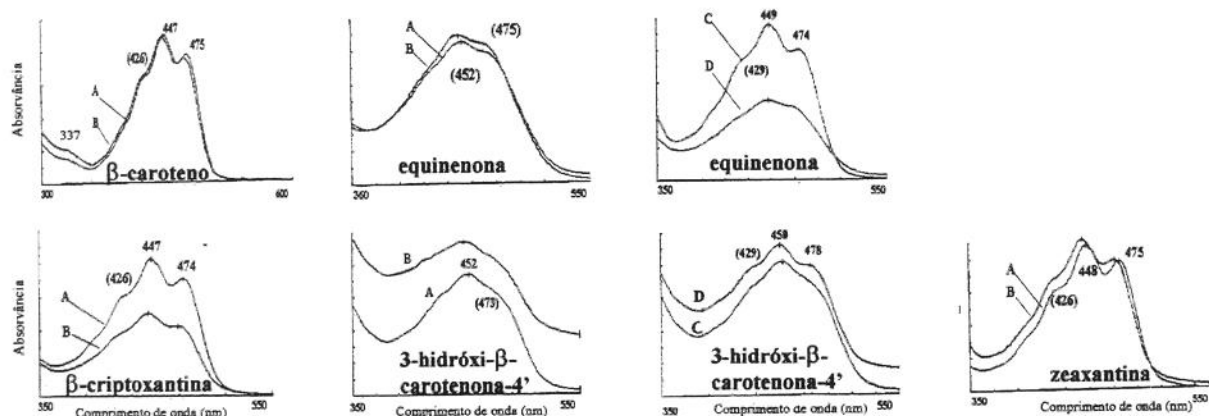
A zeaxantina foi identificada por seu espectro de absorção idêntico ao de  $\beta$ -caroteno,  $R_f$  característico de um diidroxilado e por apresentar reação positiva à acetilação e negativa à metilação.

**TABELA 2.** CARACTERÍSTICAS DOS CAROTENÓIDES DETECTADOS POR CCA E CLAE NA MICROALGA *SYNECHOCOCCUS SUBSALSUS*.

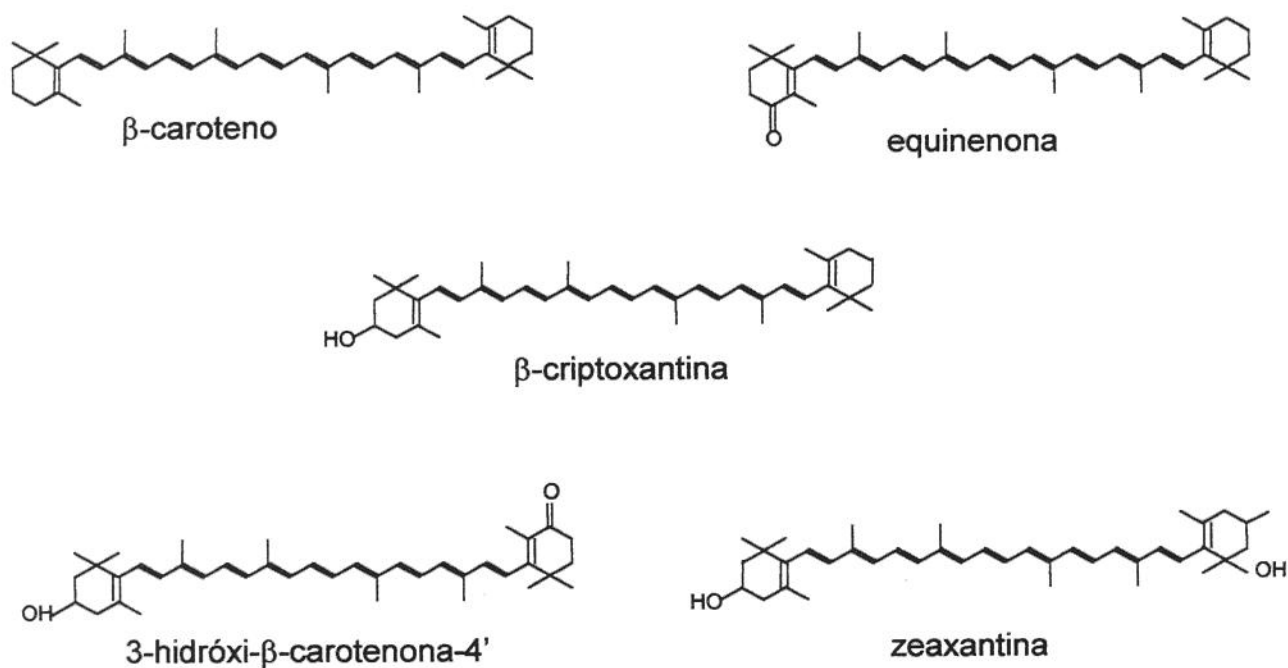
| Carotenóides                      | (CCA)                              | Rf <sup>b</sup> | Reações Químicas                 | $\lambda_{\text{máx}}^c$ (CLAE)    | tr <sup>d</sup> (min) |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <i>cis</i> -zeaxantina (a)        | -----                              | ----            | -----                            | (432), 454, 480                    | 21,5                  |
| zeaxantina                        | (426), 448, 475                    | 0,18            | <i>trans</i> +, ep-, met-, acet+ | (432), 454, 480                    | 24,0                  |
| <i>cis</i> -zeaxantina (b)        | -----                              | ----            | -----                            | (428), 448, 478                    | 26,3                  |
| <i>cis</i> -zeaxantina (c)        | -----                              | ----            | -----                            | 336 <sup>e</sup> , (429), 446, 472 | 28,2                  |
| 3-hidroxi- $\beta$ -carotenona-4' | 452, (473)                         | 0,41            | <i>trans</i> +, ep-, red+        | 480                                | 31,5                  |
| $\beta$ -criptoxantina            | (426), 447, 474                    | 0,58            | <i>trans</i> +, ep-, met-, acet+ | -----                              | -----                 |
| equinenona                        | (452), (475)                       | 0,95            | <i>trans</i> +, ep-, red+        | 464                                | 49,4                  |
| <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno    | -----                              | ----            | -----                            | (432), 454, 482                    | 57,3                  |
| $\beta$ -caroteno <sup>f</sup>    | 337 <sup>e</sup> , (426), 447, 475 | 0,98            | <i>trans</i> +                   | (432), 454, 482                    | 63,8                  |
| <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno    | -----                              | ----            | -----                            | 340 <sup>e</sup> , (430), 450, 474 | 64,8                  |

<sup>a</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtidos por espectrofotômetro, referentes às bandas (em éter de petróleo) separadas por CCA; <sup>b</sup> valores obtidos em placa de sílica gel desenvolvida com 5% metanol/tolueno; <sup>c</sup> comprimentos de onda de absorção máxima (nm), obtido pelo DAD, referentes aos picos da análise de CLAE (Figura 8). Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila; <sup>d</sup> tempo de retenção dos picos da Figura. 4; <sup>e</sup> pico *cis*; <sup>f</sup> presença de pico *cis* nos valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  do carotenóide isolado por CCA, mas a reação de fotoisomerização indicou presença majoritária da forma *trans*; ( ) – indica ombro no lugar de pico; met - metilação; ep - epóxido (reação com vapores de HCl); acet – acetilação; red – redução

Em CLAE, os carotenóides de *S. subsalsus* foram identificados com os mesmos parâmetros citados para *Hillea* sp (Tabela 2). Analisando-se os cromatogramas dos extratos saponificados e não saponificados, nota-se, como ocorreu em *Hillea* sp, a inexistência de carotenóides esterificados (Figura 8A e B). O cromatograma referente à amostra não saponificada (Figura 8A), mostrou que sua composição carotenóidica é constituída, basicamente, por  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. A diminuição significativa no pico referente a zeaxantina no cromatograma da amostra saponificada ocorreu devido às perdas provocadas pela reação de saponificação (Figura 8B). Os carotenóides isolados em CCA, equinenona e 3-hidróxi-4'-equinenona foram detectados em traço por CLAE. A  $\beta$ -criptoxantina não foi detectada devido à baixa concentração do extrato e deste pigmento na amostra. Por outro lado, a análise por CLAE detectou um maior número de isômeros de  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. Os picos 1, 3 e 4 foram identificados, tentativamente, como *cis*-isômeros de zeaxantina e os picos 6 e 8 como *cis*-isômeros de  $\beta$ -caroteno.

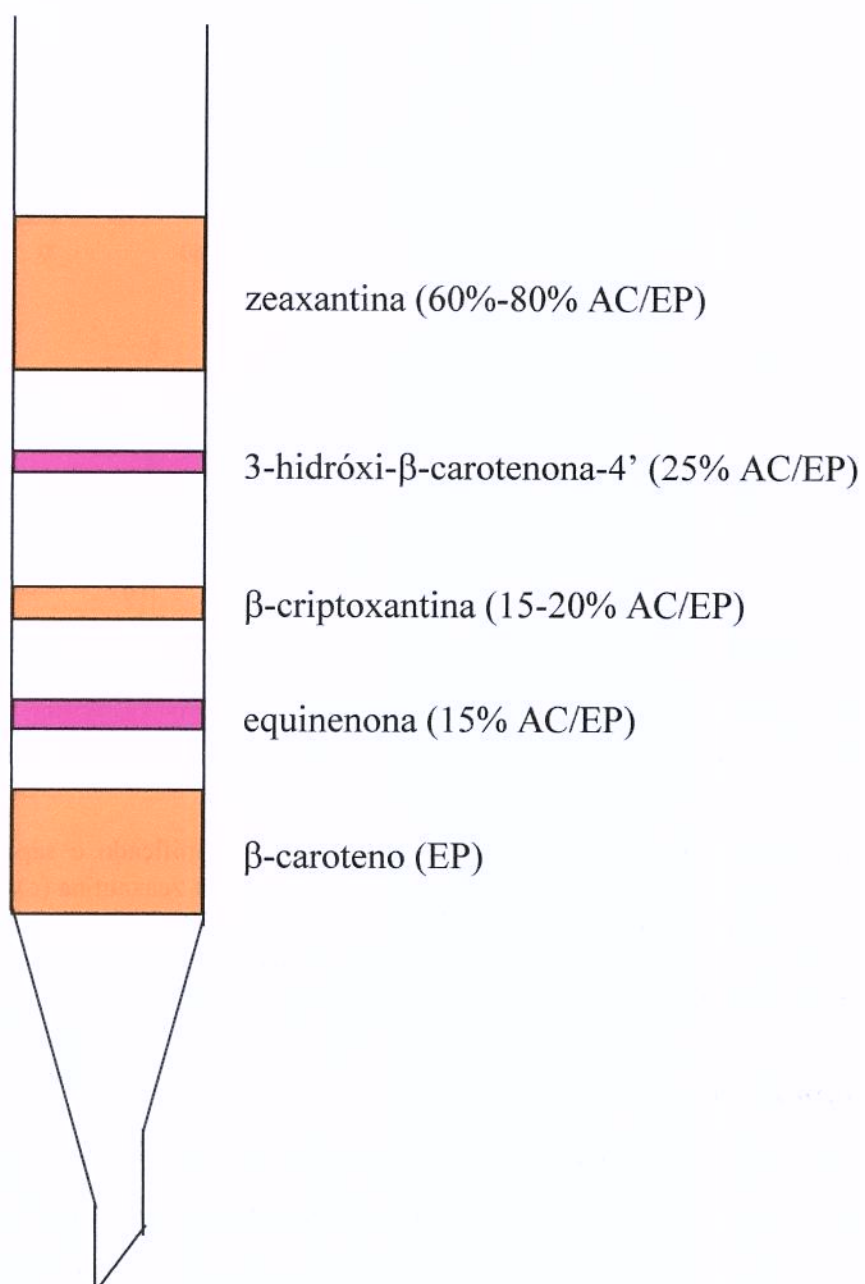


**Figura 5.** Espectros de absorção no visível (em éter de petróleo), obtidos por espectrofotômetro, dos carotenóides da microalga *Synechococcus subsalsus* isolados por CCA. Antes (A) e após (B) a reação de fotoisomerização; em etanol 95% (C) e após redução com NaHB<sub>4</sub> (D).

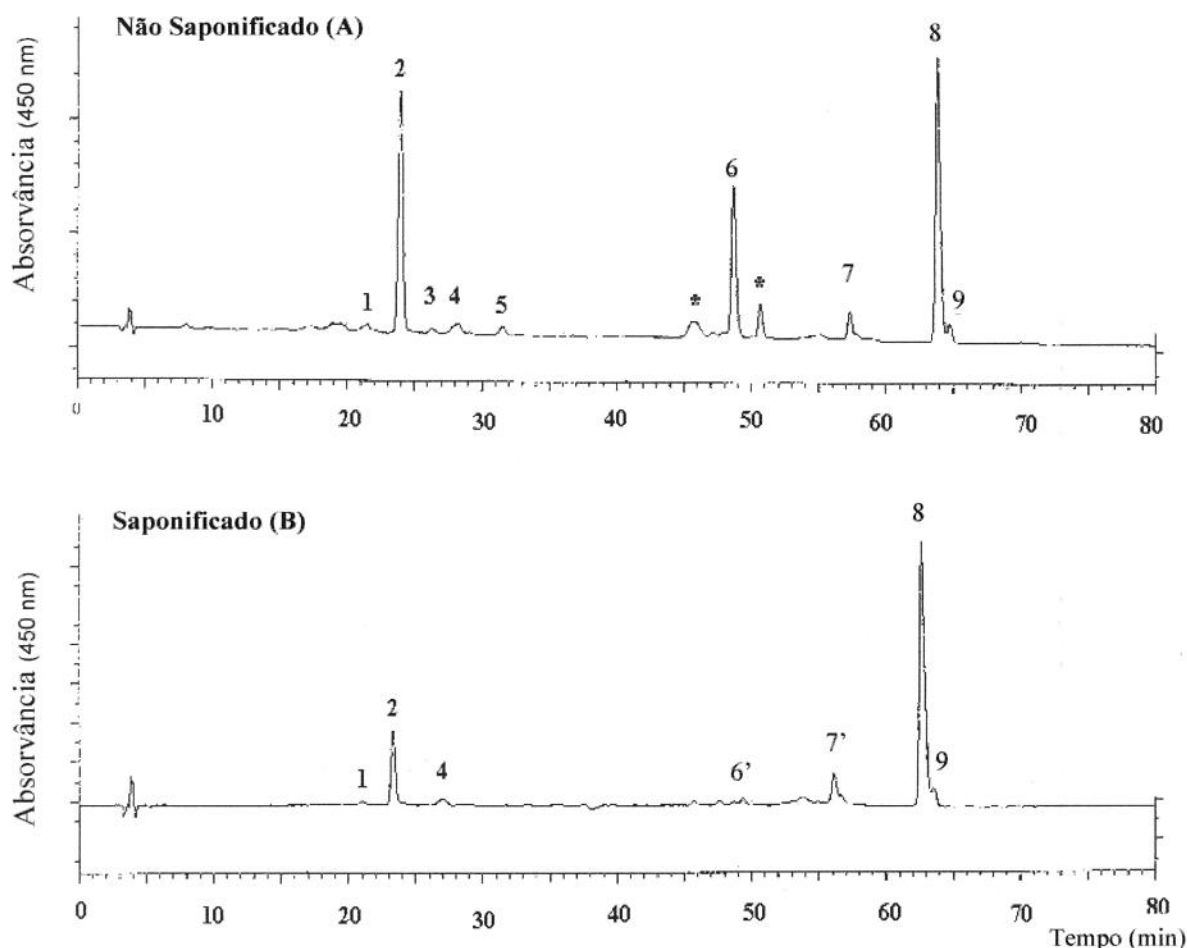


**Figura 6.** Estruturas dos carotenóides encontrados na microalga *Synechococcus subsalsus*.

### Coluna de MgO:Hiflosupercel (1:1)



**Figura 7.** Separação dos carotenóides da microalga *Synechococcus subsalsus* por CCA. EP- éter de petróleo; AC- acetona.



**Figura 8.** Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificado e saponificado de *S. subsalsus*. 1- *cis*-zeaxantina (a), 2- zeaxantina, 3- *cis*-zeaxantina (b), 4- *cis*-zeaxantina (c), 5- 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4'(?), 6- clorofila + equinenona; 6'- equinenona; 7- clorofila + *cis*- $\beta$ -caroteno (?), 7'- *cis*- $\beta$ -caroteno (?), 8-  $\beta$ -caroteno e 9- *cis*- $\beta$ -caroteno. \*clorofilas. Coluna: Licrospher 100 RP-18, 250 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: gradiente de metanol-água-acetato de etila.

### Composição quantitativa

A Tabela 3 mostra a composição quantitativa dos carotenóides isolados nas duas espécies de microalgas estudadas. A aloxantina foi o carotenóide majoritário da microalga *Hillea* sp (2660  $\mu$ g/g de peso seco), enquanto o  $\alpha$ -caroteno foi o caroteno presente em maior quantidade (360  $\mu$ g/g), confirmando as expectativas em relação a estes dois pigmentos dentro da classe Cryptophyceae. Na microalga *S. subsalsus*, a zeaxantina (800  $\mu$ g/g) e o  $\beta$ -caroteno (850  $\mu$ g/g) foram os carotenóides principais. Em ambas as microalgas, os demais carotenóides estavam presentes em concentrações baixas. A concentração total de carotenóides na *Hillea* sp foi quase o dobro da obtida na *S. subsalsus*.



**TABELA 3. CONCENTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES DAS MICROALGAS *HILLEA* SP E *S. SUBSALSUS*.**

| <i>Hillea</i> sp<br>Carotenóides | Concentração<br>µg/g peso seco | <i>S. subsalsus</i><br>Carotenóides | Concentração<br>µg/g peso seco |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| aloxantina                       | 2660                           | β-caroteno                          | 850                            |
| α-caroteno                       | 360                            | zeaxantina                          | 800                            |
| crocoxantina                     | 240                            | equinenona                          | 50                             |
| monadoxantina                    | 90                             | β-criptoxantina                     | 50                             |
|                                  |                                | 3'-hidróxi-carotenona-4'            | 30                             |
| Total                            | 3350                           |                                     | 1780                           |

A presença de β-caroteno e zeaxantina em *S. subsalsus* em quantidades apreciáveis é uma característica relevante no eventual emprego desta microalga como fonte destes pigmentos. O β-caroteno é a provitamina A mais importante e a zeaxantina está envolvida, juntamente com a luteína, na prevenção da degeneração macular. Além disto, estes dois carotenóides apresentam propriedades antioxidativas. Quanto à presença majoritária de aloxantina em *Hillea* sp, embora até o momento ainda não haja uma aplicação ou função atribuída a este pigmento, sua abundância e intensa coloração laranja poderá no futuro apresentar alguma aplicação como pigmento. A composição relativamente simples destas microalgas é um fator importante no eventual uso das mesmas como fonte de carotenóides específicos.

## Referências Bibliográficas

1. Simpson, K.L. e Chichester, C.O. (1981) *Ann. Rev. Nutr.* 1, 351.
2. Bauernfeind, J.C., Adams, C.R. e Marusich, W.L. (1981) Carotenoids as colorants and vitamin A precursors (Bauernfeind, J.C., ed) p. 564. Academic Press, New York.
3. Bendich, A. (1989) Carotenoids, chemistry and biology (Krinsky, N.I. e Mathews-Roth, M.M., eds) p. 323. Plenum Press, New York.
4. Gerster, H. (1991) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 61, 277.
5. Gaziano, J.M. e Hennekens, C.H. (1993) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 691, 148.
6. Manson, J.E., Gaziano, J.M., Jonas, M.A. e Hennekens, C.H. (1993) *J. Am. Coll. Nutr.* 12, 426.
7. Kohlmeier, L. e Hastings, S.B. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1370S.
8. Jacques, P.F., Hartz, S.C., Chylack, L.T., McGandy, R.B. e Sadowski, J.A. (1988a) *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 152.
9. Jacques, P.F., Chylack, L.T., McGandy, R.B. e Hartz, S.C. (1988b) *Arch. Ophthalmol.* 106, 337.
10. Jacques, P.F. e Chylack, L.T. Jr. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 352S.
11. Leske, M.C., Chylack, L.T. e Wu, S.Y. (1991) *Arch. Ophthalmol.* 109, 244.
12. Knekt, P., Heliovaara, M., Rissanen, A., Aromaa, A. e Aaran, R.K. (1992) *Br. Med. J.* 305, 1392.
13. Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, R.D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T.C., Farber, M.D., Gragoudas, E.S., Haller, J., Miller, D.T., Yannuzzi, L.A. e Willett, W. (1994) *J. Am. Med. Assoc.* 272, 1413.
14. Snodderly, D.M. (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1448S.
15. Khachik, F., Bernstein, P. e Garland, D.L. (1997) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1802.
16. Landrum, J.T., Bone, R.A., Sprague, K. e Moore, L. (1997) *FASEB J.* 11, 2588.
17. Block, G., Patterson, B. e Subar, A. (1992) *Nutr. Cancer* 18, 1.
18. Mayne, S.T. e Goodwin, W.J. Jr. (1993) *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1, 126.
19. Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. e Willett, W.C. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 1767.
20. Ziegler, R.G., Colavito, E.A, Hartge, P., McAdams, M.J., Schoenberg, J.B., Mason, T.J. e Fraumeni, J.F. Jr. (1996a) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 612.
21. Ziegler, R.G., Mayne, S.T. e Swanson, C.A. (1996b) *Cancer Causes Control* 7, 157.
22. Mayne, S.T. (1998) *FASEB J.* 10, 690.

23. King, T.J., Khachik, F., Bortkiewicz, H., Fukushima, L.H., Morioka, S. e Bertram, J.S. (1997) *Pure Appl. Chem.* 69, 2135.
24. Borowitzka, M.A. (1993) *Infofish Int.*, 5, 21.
25. Ben Amotz, A., Katz, A. e Avron, M. (1982) *J. Phycol.* 18, 529.
26. Renstrøm, B., Borch, G., Skulberg, O.M. e Liaaen-Jensen, S. (1981) *Phytochemistry* 20, 2561.
27. Liaaen-Jensen, S. (1978) *Marine Natural Products: biological and chemical perspectives*, (Scheuer, P.J. ed.) vol II, Chap. 1, p.1. Academic Press, New York.
28. Britton, G. (1976) *Pure Appl.Chem.* 47, 223.
29. Liaaen-Jensen, S. (1977) *Marine Natural Products Chemistry Chemosystematics* (Faukner, D.J.; Fenical, W.H. eds.) p. 239. Plenum Press, New York.
30. Liaaen-Jensen, S. (1979) *Pure Appl. Chem.* 51, 661.
31. Teixeira, V.L. (1990) Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
32. Walne, P. R. (1966) *Fish. Invest.*, London, (ser 2) 25, 53.
33. Davies, B.H. (1976) *Chemistry and biochemistry of plant pigment* (Goodwin, T.W., ed.) vol. 2, p. 38. Academic Press, London.
34. Britton, G. (1995) *Carotenoids Vol 1B Spectroscopy* (Britton; G., Liaaen-Jesen, S. e Pfander, H., eds) p. 13. Pergamon Press, London.
35. Eugster, C.H. (1995) *Carotenoids: isolation and analysis*, vol 1A (Britton, G., Liaaen-Jesen, S. e Pfander, H., eds) p. 71. Birkhäuser Verlag, Basel.
36. Pennington, F.C., Haxo, F.T., Borch, G. e Liaaen-Jensen, S. (1985) *Biochem. Syst. Ecol.* 13, 215.
37. Norgad, S., Svec, W.A., Liaaen-Jensen, S., Jensen, A. e Guillard, R.R.L. (1974) *Biochem. Syst. Ecol.*, 2, 7.
38. Cheng, J.K., Don-Paul, M. e Antia, N.J. (1974) *J. Protozool.* 21, 761.
39. Wrigt, S.W. e Shearer, J.L. (1984) *J. Chromatogr.* 294, 281.
40. Hager, A. e Stransky, H. (1970) *Arch. Mikrobiol.* 73, 77.
41. Haxo, F.T. (1993) *J. Protozool.* 30, 26A.
42. Chapman, D. J. (1965) Ph.D. Thesis, University of California, San Diego.

## ERRATA

| PÁGINA | PARÁGRAFO | LINHA     | MODIFICAÇÃO EM NEGRITO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------|-----------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4      | 2         | 9         | .., presença de luz e temperatura).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 8      | 2         | 8         | Entretanto, este efeito..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 10     | 3         | 15        | ..medicina mexicana <b>popular</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 12     | 3         | 4         | <b>Subproduto</b> do processo...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 16     | 3         | 3         | ..do tipo e <b>da</b> quantidade...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 18     | 2         | no título | 2.19. <b><i>Petunias</i></b> hybrida Vilm.                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 18     | 2         | 10        | mais intensa, ....foram maiores do que naqueles onde...                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 18     | 4         | 5         | ..foi identificada, <b>sendo caracterizada como</b> $\beta$ -criptoxantina.                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 18     | 4         | 7         | ..xantofilas livres <b>não identificadas</b> eram mais polares.                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 19     | 2         | 3         | ...em pétalas de rosas foi obtido...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 19     | 2         | 6         | et al. (1984),...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 20     | Figura 1  | 10        | 20,20a, (8'R)-luteoxantina...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 21     | Figura 1  | 1         | 21,20a, (8'S)-luteoxantina...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 21     | Figura 1  | 3         | 23, (8S,8'R)-auroxantina...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 23     | 2         | 2         | exemplo,...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 23     | 2         | 9         | "Double" e <i>polianthes</i> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 32     | 4         | 1         | .., <b>vários</b> outros tipos...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 32     | 4         | 2         | ... por novas biotecnologias,...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 32     | 5         | 1         | ..é o eucarionte mais <b>halófilo</b> conhecido...                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 36     | 4         | 1 e 3     | ... <b>cantaxantina</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 37     | 1         | 1/2       | ...e de novas biotecnologias <b>ao</b> cultivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 45     | Abstract  | 12        | ..., the main <b>commercial</b> source of ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 45     | Abstract  | 13        | ... of these flowers as source of this...                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 46     | Resumo    | 13/14     | fonte <b>comercial</b> de luteína...<br>destas flores <b>como fonte</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 47     | 3         | 9         | no qual <b>foi observado</b> um aumento....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 47     | 3         | 14        | ... na medicina <b>popular</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 48     | 1         | 4 a 6     | <b>..., no presente trabalho foram selecionadas as flores amarelas e laranjas de <i>Cosmos sulphureus</i> e as amarelas de <i>Thelechitonina trilobata</i> com o objetivo de caracterizar e quantificar seus carotenóides principais. Tanto <i>C. sulphureus</i> como <i>T. trilobata</i> crescem espontaneamente e florescem por quase todo o ano.</b> |
| 48     | 4         | 1 e 2     | No caso de flores <b>amarelas</b> de <i>C. sulphureus</i> , uma amostra constituída de três unidades foi coletada de cada um dos três lotes avaliados <b>para flores completas</b> .                                                                                                                                                                    |
| 48     | 4         | 4         | entre si. <b>O teor de luteína foi calculado para os cinco lotes da seguinte forma: entre três lotes próximos e entre três lotes distantes.</b>                                                                                                                                                                                                         |
| 49     | 1         | 6         | ... em relação ao <b>volume do</b> extrato.                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 50     | 1         | 6         | .. detector <b>de</b> arranjo de diodos ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 51     | 1         | 1         | (Figura <b>2B</b> : pico 1....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 54     | Figura 5  | 1         | .., obtidos por CLAE,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|    |               |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|---------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 54 | 2             | 2               | pelo desvio padrão <b>do valor médio de luteína</b> obtido para lotes próximos e distantes ..                                                                                                                                                                                                                      |
| 55 | Tabela (nota) | 1               | <sup>1</sup> lotes distantes e <b>próximos</b> entre si;                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 55 | 2             | 5 e 6           | <b>Baseado</b> nesta distribuição, o teor de luteína <b>nas</b> flores completas de <i>T. trilobata</i> foi <b>estimado</b> nos dois lotes analisados (370 e 550 µg/g).                                                                                                                                            |
| 56 | 2             | 1               | ... <i>C. sulphureus</i> e <i>T. trilobata</i> de 670 ...                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 56 | 2             | 6               | O fato de <i>C. sulphureus</i> e <i>T. trilobata</i> crescerem espontaneamente e <b>florescerem</b> , praticamente, por quase..                                                                                                                                                                                    |
| 61 | 2             | 1/2             | ..., até o momento,                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 61 | 2             | 4               | e, dependendo da variedade,                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 63 | 2             | 2               | relação ao <b>volume do</b> extrato.                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 63 | 3             | 9               | .., empregou-se acetona <b>pura</b> e concentrações crescentes                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 63 | 4             | 3               | ..gel (desenvolvida com 5% de metanol em tolueno) e <b>em</b> cromatografia líquida ...                                                                                                                                                                                                                            |
| 63 | 4             | 10              | ...rearranjo epóxido-furanóximo...                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 65 | Tabela        | 9               | criptoxantina                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 65 | Tabela (nota) | 4               | Figura 4                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 66 | Figura        | 4               | <b>9-cis</b> -violaxantina ....                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 67 | 1             | 5               | poli- <i>cis</i> -licopeno (prolicopeno)                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 67 | 2             | 6               | ...às ligações duplas                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 67 | 2             | 11/12           | ... grupo hidroxílico em ...                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 67 | 3             | 1               | como α-criptoxantina ou zeinoxantina ( <b>sem vírgulas</b> )                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 67 | 3             | 3               | ..porém com <b>valores de λ<sub>max</sub></b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 68 | Figura CCA    | α-criptoxantina | α-criptoxantina <b>ou zeinoxantina</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 69 | 3             | 1               | <b>A fração identificada como</b> <i>trans</i> -zeaxantina                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 69 | 4             | 3               | ... revelando a <b>presença de</b> grupo epóxido.                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 69 | 4             | 5               | ..17 nm <b>nos valores de</b> seus λ <sub>max</sub> ...                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 69 | 5             | 1               | .. <b>valor de R<sub>f</sub> típico</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 69 | 5             | 3/4             | Dois grupos 5,6-epóxido                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 69 | 6             | 5               | .., respectivamente, e podem ..                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 70 | 1             | 3-5             | O critério na identificação dos ésteres foi o desaparecimento de alguns picos, que <b>estavam presentes</b> no cromatograma do extrato saponificado, e o aumento de outros no cromatograma do extrato saponificado. <b>Além disto, os perfis dos espectros e os λ<sub>max</sub> destes picos eram semelhantes.</b> |
| 70 | 1             | 8               | Tirar: (levando em conta o seu tempo de retenção)                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 70 | 1             | 11              | Colocar: <b>A cis-zeaxantina e cis anteraxantina foram detectadas também na forma de diésteres (picos 22 a 24). A identificação dos carotenóides esterificados como mono ou diésteres baseou-se no tempo de retenção obtido.</b>                                                                                   |
| 71 | tabela        | 2 e 4           | violaxantina                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 71 | 2             | 7               | ...semelhantes aos de seus carotenos ( <b>sem a</b>                                                                                                                                                                                                                                                                |

|    |          |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|----------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |          |         | <b>palavra espectros)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 73 | Figura 6 |         | faltou: o <b>ou</b> entre as estruturas de $\alpha$ -criptoxantina e zeinoxantina; falta de nitidez das duplas                                                                                                                                                                                                           |
| 74 | 1        | 9       | .., assim como as de <i>trans</i> e <i>cis</i> - $\zeta$ (8%) e <b><math>\beta</math>-caroteno (7%)</b>                                                                                                                                                                                                                  |
| 75 | 1        | 2       | uso como fonte ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 75 | 1        | 3 a 6   | ..., as propriedades antioxidativas, <b>citadas na literatura para estes pigmentos e a presença de carotenóides provitamínicos</b> ( $\beta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina e $\gamma$ -caroteno) reforçam esta indicação. Por outro lado, <b>a composição complexa encontrada</b> não indica o uso destas flores ... |
| 78 | Autores  | 4       | Elisabete                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 78 | Autores  | 5       | CEP: 24001-970                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 80 | 2        | 5       | .., aeração (2,0 l de ar/min)...                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 80 | 3        | 2       | ... por filtração à vácuo ..                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 81 | 1        | 3       | ... em relação <b>ao volume</b> do extrato.                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 81 | 2        | 9       | Concentrações crescentes de água em acetona.                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 81 | 3        | 1       | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 81 | 3        | 6       | ... um detector <b>de</b> arranjo de diodos..                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 82 | 3        | 3       | ..tabelados por Davies (6) e Britton (7)....                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 82 | 5        | 3       | ...e valores de Rf <b>na</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 84 | Fig. 1   | 2       | Faltou: o número <b>1</b> no pico <i>cis</i> de <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno-331 nm                                                                                                                                                                                                                                   |
| 87 | 1        | 7       | ... tempo de retenção típicos de <b>carotenóides</b> mono, di e triidroxilados,....                                                                                                                                                                                                                                      |
| 87 | 1        | 11      | luteína, respectivamente, e...                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 87 | 2        | 2       | ..,trata-se, provavelmente, de um...                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 87 | 2        | 3       | ..de um <b>carotenóide triidroxilado</b> .                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 87 | 2        | 4       | , pois, enquanto na amostra <b>não</b> saponificada o <b>DAD registrou predominantemente</b> o espectro do pico 3...                                                                                                                                                                                                     |
| 87 | 2        | 5       | ..., após a saponificação, <b>passou</b> a registrar o espectro do pico 4...                                                                                                                                                                                                                                             |
| 87 | 2        | 6       | , o qual <b>era</b> semelhante ao ...                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 87 | 2        | 7       | (Fig. 4B, pico ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 87 | 3        | 3       | ; entretanto, não ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 87 | 3        | 7       | ..em dois critérios <b>(10)</b> : ...                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 88 | Fig. 4   | 1       | ...não saponificado <b>(A)</b> e saponificado <b>(B)</b> de....                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 88 | Fig. 4   | 6       | , 480 nm). Coluna : Licrospher                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 89 | 2        | 3       | ..e o $\beta$ -caroteno....                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 90 | Fig 5    |         | Faltou: <b>nitidez</b> nas duplas das estruturas                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 91 | 1        | 5       | ..,violaxantina e neoxantina foram inseridas... <b>(sem vírgula)</b>                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 91 | 2        | 9       | ..nos tempos de retenção esperados para...                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 91 | 2        | 10 e 11 | .. dos picos de clorofilas que poderiam tê-los mascarado ...                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 92 | 3        | 1       | ... acrescentou <b>novos</b> carotenóides à classe Pleurastrophyceae, ou seja, luteoxantina...                                                                                                                                                                                                                           |
| 92 | 3        | 4       | .... <i>T. suecica</i> , identificaram <b>(sem a palavra também)</b> ...                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 92 | 3        | 7       | ..., encontrados no extrato <b>(sem a palavra também)</b> ....                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 92 | 3        | 8       | , o triidroxí- $\alpha$ -caroteno, identificado por Wright e Shearer (12), ..                                                                                                                                                                                                                                            |



|         |                   |       |                                                                                                   |
|---------|-------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 95 e 96 | Autores           | 1     | Elisabete                                                                                         |
| 95 e 96 | Endereços/autores | 3     | CEP: 24001-970                                                                                    |
| 97      | 3                 | 2     | ..., por exemplo,...                                                                              |
| 97      | 4                 | 4     | Nas Cryptophyceae...                                                                              |
| 97      | 5                 | 3     | $\beta$ -Caroteno, ....(sem o A no início)                                                        |
| 97      | 5                 | 4     | ... nas Cyanophyceae.                                                                             |
| 99      | 3                 | 1     | A separação dos....                                                                               |
| 99      | 3                 | 3     | ...concentrações crescentes de ...                                                                |
| 99      | 5                 | 5     | Os espectros dos picos foram....                                                                  |
| 99      | 6                 | 2     | Modelo DU-640) no intervalo... (sem a vírgula)                                                    |
| 100     | 3                 | 1     | Os carotenóides isolados ....(em lugar de Os pigmentos)                                           |
| 100     | 5                 | 1     | ...foram $\zeta$ - e $\epsilon$ -caroteno, $\alpha$ -caroteno ( <i>trans</i> e <i>cis</i> ) e.... |
| 100     | 6                 | 1     | ...espectros de <i>cis</i> - $\alpha$ e $\beta$ -caroteno...                                      |
| 101     | 1                 | 2     | , mas não havia sido registrada ainda a presença de ...                                           |
| 101     | Tabela 1          |       | Faltou alinhar a segunda coluna                                                                   |
| 101     | 2                 | 1     | A fração correspondente a crocoxantina ...                                                        |
| 101     | 2                 | 4     | ...grupo às ligações duplas foi...                                                                |
| 101     | 2                 | 7     | ..., que corresponde ao peso...                                                                   |
| 102     | 3                 | 1     | A fração caracterizada como $\beta$ -criptoxantina apresentou espectro ....                       |
| 102     | 3                 | 4     | ... às ligações duplas.                                                                           |
| 102     | 4                 | 1     | O cetocarotenóide não identificado apresentou....                                                 |
| 102     | 4                 | 7     | ...característica, o cetocarotenóide reduzido                                                     |
| 102     | 4                 | 10    | ...revelou que este pigmento apresentava-se nas formas ...                                        |
| 103     | Figura 1          | nota  | $\text{NaBH}_4$                                                                                   |
| 105     | 2                 | 6     | .. a altura do pico da aloxantina aproximou-se às das ....                                        |
| 105     | 2                 | 10    | ...devido à baixa concentração destes pigmentos na amostra. (sem do extrato)                      |
| 105     | Figura 4          | 1     | ..extrato não saponificado (A) e saponificado (B)...                                              |
| 107     | Tabela 2          | 1     | Faltou: $\lambda_{\text{max}}$ (CCA)                                                              |
| 107     | Tabela 2          | 6     | 3-hidróxi- $\beta$ -                                                                              |
| 107     | Tabela 2 (nota)   | 4     | Figura 8                                                                                          |
| 107     | 1                 | 8     | , equinenona e 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4'.....                                             |
| 108     | Figura 5          | 3     | $\text{NaBH}_4$                                                                                   |
| 110     | Figura 8          | 1     | extrato não saponificado (A) e saponificado (B)...                                                |
| 110     | Figura 8          | 3     | ..carotenona-4', (sem o ponto ?)                                                                  |
| 110     | 1                 | 7 e 8 | ... em <i>Hillea</i> sp foi quase o dobro da obtida para <i>S. subsalsus</i> .                    |
| 111     | Tabela 3          | 5     | 3-hidróxi- $\beta$ -carotenona-4'.....                                                            |
| 111     | 1                 | 5 e 6 | ...embora, até o momento, não haja uma aplicação....                                              |