



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E
SAÚDE**

RENATA LIMA NASCIMENTO

**CAROTENOIDES DE DESCARTE DE VEGETAL FOLHOSO:
OBTENÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Salvador
2015

RENATA LIMA NASCIMENTO

**CAROTENOIDES DE DESCARTE DE VEGETAL FOLHOSO:
OBTENÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Linha de Pesquisa: Vigilância de Alimentos e Saúde

Orientadora: Prof^a Dr^a. Itaciara Larroza Nunes

Salvador
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde do SIBI /UFBA.

N244 Nascimento, Renata Lima

Carotenoides de descarte de vegetal folhoso: obtenção e potencial antioxidante. / Renata Lima Nascimento. - Salvador, 2015.

93 f. : il.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Itacira Larroza Nunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2015.

1. Carotenoides. 2. Antioxidantes. 3. Carotenoides. I. Nunes, Itacira Larroza. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição. III. Título.

CDU: 612.39

TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA LIMA NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

CAROTENÓIDES DE DESCARTE DE VEGETAL FOLHOSO: OBTENÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes

Doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas
Professora da Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Rogéria Comastri de Castro Almeida

Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas
Professora da Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Cléia Maria de Jesus Benevides

Doutorado em Química pela Universidade Federal da Bahia
Professora da Universidade do Estado da Bahia

Salvador – Bahia, 31 de março de 2015

Dedico aos meus pais e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças para lutar e realizar meus sonhos.

Aos meus pais, por tudo. Devo a eles cada conquista que realizei em minha vida.

À minha irmã, por me entender e me incentivar.

Aos meus amigos e namorado, por toda a força e energia positiva sempre.

À minha orientadora, Professora Itaciara, pela confiança, incentivo, ensinamentos, e orientação.

Às alunas de Iniciação Científica, Tayane e Luciana, pela ajuda nas análises e finais de semana de dedicação.

Aos técnicos dos Laboratórios da Escola de Nutrição da UFBA, Luís e Ayse, pela colaboração e apoio nas dificuldades.

A todos os docentes e colegas do mestrado, pela dedicação e apoio.

Ao Sr. José Carlos, por toda a ajuda e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento do projeto e auxílio dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que, de alguma forma, colaboraram para que meu trabalho tenha sido realizado e a minha jornada, completa.

(...) a respeito do sonho: “Tenho sempre um e estou sempre em busca dele. Quando me aproximo, vejo que ele se distancia e tenho de continuar. Estou chegando perto e ele está mais longe. E nunca paro de caminhar”.

Veia Bailarina - Ignácio de Loyola Brandão

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos naturais, lipofílicos, de cores atraentes, e que apresentam efeitos benéficos à saúde humana, como precursores da vitamina A, atividade antioxidante e participação em diversos processos fisiológicos. Por isso, a extração destes pigmentos é vantajosa para a indústria de alimentos, principalmente quando um produto sem valor comercial, como descarte de vegetal folhoso, é utilizado como matriz. O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologia para a obtenção de carotenoides, a partir da folha externa do repolho, com vistas à aplicação como corante, antioxidante natural e/ou na fortificação de alimentos. Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-1} , para definir as variáveis significantes na extração de carotenoides, sendo estudados os seguintes fatores e níveis: temperatura (30 e 50°C), relação massa:volume (0,5:15 e 0,5:25 g/mL), número de extrações (3 e 5), tempo (30 e 60 minutos) e esterilização (sim ou não), totalizando 16 experimentos. O etanol foi utilizado como solvente, por ser reconhecido como seguro (GRAS) e a saponificação simultânea foi empregada para eliminar uma etapa do método. Considerando-se as variáveis que apresentaram efeito significativo na resposta, foi realizado um planejamento composto central 2^3 testando-se: tempo de extração (60, 90 e 120 min), relação massa:volume (0,5:10, 0,5:15 e 0,5:20 g/mL), e número de extrações (2, 3 e 4 vezes), com amostras esterilizadas e temperatura de 30°C. As respostas para este planejamento foram carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$), porcentagem de redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), todos determinados por espectrofotometria, tempo de indução (h) do óleo de palma refinado acrescido dos extratos, avaliado em Rancimat, e cor (CIELAB) analisada em colorímetro. Extração convencional com acetona foi utilizada como controle e este extrato, assim como o da condição ótima do planejamento, foi caracterizado quanto aos carotenoides majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar os efeitos e interações entre as variáveis independentes dos planejamentos experimentais ($p < 0,05$). O teor de carotenoides obtido pelo método convencional foi de $416,67 \pm 6,60 \mu\text{g/g}$, e de $393,30 \pm 3,73 \mu\text{g/g}$ para a melhor condição do planejamento (amostra esterilizada, relação massa:volume de 0,5:10 g/mL e 2 extrações de 120 min a 30°C com saponificação simultânea), representando 94,39% do obtido no convencional, com menor tempo de análise e volume de solvente. O tempo de extração foi o fator que teve maior efeito em todas as respostas. Os dois tipos de extratos apresentaram all-*trans*- β -caroteno como pigmento principal, seguido de luteína. A porcentagem de inibição do DPPH foi de $32,06 \pm 1,63$ e $30,88 \pm 0,22$ % e do ABTS de $25,47 \pm 0,60$ e $20,11 \pm 0,04$ %, para os extratos de carotenoides obtidos pelo método convencional e condição ótima do planejamento, respectivamente. Entretanto, os mesmos não aumentaram a estabilidade oxidativa do óleo de palma refinado submetido ao Rancimat. A folha externa de repolho apresentou-se como uma potencial fonte para a obtenção de carotenoides, predominantemente all-*trans*- β -caroteno e luteína, produtos de alto valor agregado, com possibilidade de aplicação na indústria de alimentos em processos de fortificação e/ou como corantes e antioxidantes naturais, devendo, para isso, ser testados em matriz alimentícia na ausência de oxigênio e de temperaturas elevadas.

Palavras-chave: β -caroteno; extração; atividade antioxidante; DPPH; ABTS; superfície de resposta.

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments, lipophilic, with attractive colors, and have beneficial effects on human health, such as vitamin A precursors, antioxidant activity and participation in various physiological processes. Therefore, the extraction of these pigments is advantageous for the food industry, especially when a product without commercial value, such as the dispose of leafy vegetable, is used as matrix. The aim of this study was to establish methodology to obtain carotenoids from cabbage outer leaf, in order to apply as a dye, natural antioxidant and/or food fortification. Initially was performed a factorial design 2^{5-1} , to define the significant variables in carotenoids extraction, with the following factors and levels: temperature (30 and 50 ° C), mass ratio: volume (0.5:15 e 0.5:25 g/mL) number of extractions (3 and 5), time (30 and 60 min) and sterilization (yes or no), a total of 16 experiments. Ethanol was used as solvent for being recognized as safe (GRAS), and a simultaneous saponification was employed to remove a stage of the method. Considering the variables that had a significant effect on the response, a central composite design 2^3 was performed testing: extraction time (60, 90 and 120 min), mass ratio: volume (0.5: 10, 0.5: 15 and 0.5: 20 g/mL), and the number of extractions (2, 3 and 4 times) with sterile samples and 30 ° C. The answer to this design were carotenoids ($\mu\text{g/g}$), inhibition percentage of radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), determined by spectrophotometry, induction time (h) of refined palm oil with addition of the extracts, assessed at Rancimat, and color (CIELAB) analyzed in colorimeter. Conventional extraction with acetone was used as control and this extract, as well as the extract of the optimum condition were analyzed and characterized by High-performance liquid chromatography (HPLC). Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the effects and interactions between the independent variables of the experimental design ($p < 0.05$). The carotenoid content obtained by the traditional method was $416.67 \pm 6.60 \mu\text{g/g}$ and $393.30 \pm 3.73 \mu\text{g/g}$ for the best condition of experimental design (sterilized sample, mass ratio: volume of 0.5:10 g/mL, and 2 extractions 120 min at 30 ° C with simultaneous saponification), representing 94.39% of the conventional obtained with less analysis time and volume of solvent. The extraction time was the factor that had the highest effect on all the answers. The extracts showed all-trans- β -carotene as a major pigment, followed by lutein. The percentage of inhibition of DPPH was 32.06 ± 1.63 and $30.88 \pm 0.22\%$ and ABTS 25.47 ± 0.60 and $20.11 \pm 0.04\%$ for carotenoids extracts obtained by the conventional method and optimal experimental design condition, respectively. However, they did not increase the oxidative stability of refined palm oil submitted to the Rancimat. The cabbage outer leaf was presented as a potential source for obtaining carotenoids, predominantly all-trans- β -carotene and lutein, high value-added products, with possible application in the food industry fortification processes and/or as natural colorants and antioxidants, should for that reason be tested in food matrix in the absence of oxygen and high temperatures.

Keywords: β -carotene; extraction; antioxidant activity; DPPH; ABTS; response surface.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Exemplos de estruturas químicas dos carotenos (A) e xantofilas (B). Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008).....20
- Figura 2** - Reação de β -caroteno (1) para retinol (3) por meio de enzima dioxigenase (2) (painel A); ou por meio de enzima mono-oxigenase (4) e diol intermediários (5) (painel B). A atividade enzimática é realizada sobre a posição central do β -caroteno. Fonte: Fernández-García et al. (2012).....21
- Figura 3** – Vias de reações consideradas para eliminação dos radicais oxidantes por carotenoides. Fonte: Skibsted (2012).....22
- Figura 4** – Espaço de cor CIELAB. Fonte: Konica Minolta (1998).....27
- Figura 5** – Estrutura do DPPH e sua redução por um antioxidante. Fonte: Ramadan (2010).....29
- Figura 6** – Oxidação do ABTS com $K_2S_2O_8$ e geração do $ABTS^+$. Fonte: Gülçin (2012).....30
- Figura 7** – Representação esquemática do funcionamento do Rancimat. Fonte: Metrohm (2009).....31
- Figura 8** – Distribuição (%) da produção inicial perdida ou desperdiçada em diferentes fases da cadeia de fornecimento alimentar para frutas e vegetais, em diferentes regiões do mundo. Fonte: FAO (2011).....34
- Figura 9** – Perda de vegetais folhosos durante período de cinco meses de empresa atacadista de frutas e hortaliças na CEASA, localizada na Região Metropolitana de Salvador, no Estado da Bahia.....35

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Principais etapas em análise de carotenoides.....44

CAPÍTULO III

Figura 1 - Gráficos de Pareto para os efeitos dos fatores estudados no planejamento composto central 2^3 sobre as repostas (A) carotenoides totais, (B) % de redução do DPPH e (C) % de redução do ABTS.....80

Figura 2 – Superfícies de resposta para os resultados do planejamento composto central 2^3 sobre as repostas: carotenoides totais, % de redução do DPPH e % de redução do ABTS.....82

Figura 3 – Cromatogramas dos extratos de carotenoides, obtidos por CLAE, para extração realizada de acordo com (A) método convencional e (B) condição ótima do planejamento....83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Principais carotenoides de vegetais folhosos.....	24
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Métodos de extração de carotenoides por extração convencional em fontes vegetais.....	47
Tabela 2 – Estudos de extração de carotenoides por extração assistida por ultrassom em fontes vegetais.....	54
Tabela 3 – Estudos de extração de carotenoides por extração assistida por micro-ondas em fontes vegetais.....	57
Tabela 4 – Estudos de extração de carotenoides por extração por fluido supercrítico em fontes vegetais.....	61

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Condições experimentais do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$ e resposta para extração de carotenoides em folha externa de repolho.....	76
Tabela 2 – Efeitos dos fatores do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$	76
Tabela 3 - Condições experimentais do planejamento composto central e respostas para extração de carotenoides, % de redução do DPPH, % de redução do ABTS, tempo de indução e cor (CIELAB).....	78
Tabela 4 – Equações do modelo e R^2 (coeficiente de determinação) para as respostas carotenoides totais, % de redução do DPPH e % de redução do ABTS.....	79
Tabela 5 – Carotenoides identificados por HPLC obtidos no ponto ótimo do planejamento e a partir da extração convencional.....	84
Tabela 6 – Tempo de indução do óleo de palma refinado sem antioxidantes, com extratos de carotenoides da folha externa de repolho, e com TBHQ.....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERÊNCIAS	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. CAROTENOIDES	19
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	19
1.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS	20
1.3. FONTES ALIMENTARES	23
1.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES A PARTIR DE VEGETAIS.....	24
1.5. COR	27
1.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CAROTENOIDES	28
1.6.1. Atividade antioxidante pelo radical DPPH	29
1.6.2. Atividade antioxidante pelo radical ABTS	30
1.6.3. Estabilidade oxidativa em Rancimat	31
2. DESCARTE DE VEGETAIS	33
3. REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO II

ARTIGO I: MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS: REVISÃO.....	19
INTRODUÇÃO.....	42
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM ALIMENTOS.....	43
Extração convencional	45
Extração assistida por ultrassom.....	52

Extração assistida por micro-ondas	55
Extração por líquido pressurizado	58
Extração com fluido supercrítico	59
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64

CAPÍTULO III

ARTIGO II: OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES A PARTIR DA FOLHA EXTERNA DO DESCARTE DE REPOLHO.....	68
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1. AMOSTRAS.....	71
2.2. EXTRAÇÃO/OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CAROTENOIDES	71
2.2.1. Extração convencional.....	71
2.2.2. Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁽⁵⁻¹⁾	72
2.2.3. Planejamento Composto Central 2 ³	72
2.3. ANÁLISE DOS CAROTENOIDES MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	72
2.4. COR	73
2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	73
2.5.1. Atividade Antioxidante Total através do Radical DPPH	73
2.5.2. Atividade Antioxidante Total através do radical ABTS.....	74
2.5.3. Aplicação dos extratos de carotenoides como antioxidantes em óleo de palma refinado	74
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS	75
3.2. ANÁLISE DOS CAROTENOIDES POR CLAE	83
3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE OXIDATIVA	84
3.3.1. Determinação da atividade antioxidante através da captura do radical DPPH... 84	

3.3.2.	Determinação da atividade antioxidante através da captura do radical ABTS...	85
3.3.3.	Oxidação acelerada em Rancimat.....	86
3.4.	COR.....	87
4.	CONCLUSÃO	88
5.	AGRADECIMENTOS.....	89
6.	REFERÊNCIAS	89
	CONCLUSÃO GERAL	93

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais biossintetizados por plantas, algas, fungos, leveduras e bactérias, sendo encontrados em vegetais, folhas, frutas, raízes, flores, peixes, invertebrados e pássaros. Alguns carotenoides apresentam importante função nutricional na dieta de humanos como precursores da vitamina A, que é essencial para a visão, diferenciação das células, desenvolvimento embriológico e outros processos fisiológicos (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; VERONEZI e JORGE, 2011).

O interesse por estes pigmentos tem aumentado muito nos últimos anos devido à descoberta de sua atividade antioxidante, através do sequestro e extinção de radicais livres, reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, imunodeficiências, degeneração macular e formação de cataratas (SKIBSTED, 2012; KRINSKY, 1994).

A obtenção de carotenoides é uma vantagem para a indústria de alimentos, pois os mesmos podem ser utilizados como antioxidantes naturais e na produção de alimentos funcionais (SHI et al., 2013; WANG et al., 2007). Além disso, os carotenoides também têm sido largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais, principalmente de aves e peixes. As indústrias de alimentos e farmacêuticas vêm buscando substituir os corantes sintéticos por naturais devido ao maior apelo do produto natural (VALDUGA et al., 2009).

Segundo o Relatório do Mercado Global de Carotenoides, a Companhia de Comunicações Empresarial (BCC Research) estimou que o valor do mercado mundial de carotenoides utilizados comercialmente foi cerca de US\$ 1,2 bilhão em 2010, com uma chance de crescer para US\$ 1,4 bilhões em 2018, com uma taxa de crescimento anual composta de 2,3% (MÄRZ, 2011).

O valor de mercado do β -caroteno, estimado em cerca de US\$ 250 milhões em 2007, aumentou para US\$ 261 milhões em 2010. Esse mercado deve crescer para 334 milhões de dólares americanos em 2018, a uma taxa composta de crescimento anual de 3,1%. O valor de luteína foi de cerca de \$ 233.000.000 em 2010, e deve chegar a \$ 309.000.000 em 2018, com uma taxa de crescimento anual composta de 3,6 (MÄRZ, 2011).

Os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Dentre os estudos realizados, destaca-se a produção de carotenoides pelos microrganismos *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora*,

Dunaliella salina e *Haematococcus pluvialis* (VALDUGA et al., 2009). Alguns destes pigmentos do reino vegetal são: bixina, extraída do urucum; crocina do açafrão; capsantina da páprica; extratos de vegetais folhosos contendo xantofilas e licopeno do tomate (BRITTON, LIAAEN-JENSEN, e PFANDER, 1995; PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014).

A grande maioria dos vegetais e frutas tropicais apresenta na sua composição algum tipo de carotenoide que pode ser extraído. Apesar disso, aproximadamente 35% de toda a produção agrícola brasileira vão para o lixo, sendo que desse total, 30% estão nas centrais de abastecimento e 10% nos supermercados e domicílios, colocando o Brasil entre os dez países que mais desperdiçam alimentos no mundo (CARVALHO, 2009).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo utilizar vegetal folhoso impróprio para comercialização, doados por uma rede atacadista local, para a obtenção de carotenoides, que além da reconhecida função corante, podem ser considerados aditivos funcionais, ou seja, um produto com alto valor agregado para possível uso como antioxidante natural ou para fortificação de alimentos com pró-vitamina A.

2. REFERÊNCIAS

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids Today and Challenges for the future**. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (eds). Carotenoids vol 1A: Isolation and Analysis. Birkhauser Verlag, Basel. p.1-11, 1995.

CARVALHO, D. Fome e desperdício de alimentos. **Desenvolvimento**, setembro/outubro de 2009. Disponível em: <http://desafios2.ipea.gov.br/sites/000/17/edicoes/54/pdf/rd54not04.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2013.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**. v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

MARZ, U. The global market for carotenoids. Technical Report FOD025D. **Business Communications Company**, Inc. Norwalk, CT, 2011. Disponível em: [http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-\\$1.4-billion-2018](http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-$1.4-billion-2018). Acesso em 24 de março de 2014.

PRADO, J. M.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, A. A. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables – Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 29-66, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenóides**: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 99 p.

SHI, X. et al. Effect of modifier on the composition and antioxidant activity of carotenoid extracts from pumpkin (*Cucurbita maxima*) by supercritical CO₂. **Food Science and Technology**, v. 51, p. 433-440, nov. 2013.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2409–2417, fev. 2012.

VALDUGA, E. et al., Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, out. 2009.

VERONEZI, C. M; JORGE, N. Carotenoides em abóboras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 9-20, jan./jun. 2011.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36–41, 2007.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer metodologia para a obtenção de carotenoides, a partir da folha externa do repolho, com vistas à aplicação como corante, antioxidante natural, e/ou na fortificação de alimentos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os carotenoides da folha externa do repolho utilizando metodologia convencional;
- Estabelecer método alternativo para a obtenção de um concentrado rico em carotenoides a partir da folha externa de repolho, utilizando metodologia de superfície de resposta, com avaliação do efeito de múltiplas variáveis e suas interações;
- Utilizar o método estabelecido para a obtenção do extrato rico em carotenoides a partir da folha externa do repolho;
- Determinar a cor dos extratos de carotenoides obtidos através da escala CIELAB.
- Caracterizar os extratos obtidos quanto ao conteúdo e carotenoides majoritários por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente;
- Caracterizar os extratos de carotenoides obtidos com relação à atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico));
- Comparar o efeito antioxidante dos extratos de carotenoides obtidos e do antioxidante sintético TBHQ (terc-butil-hidroquinona) na oxidação lipídica do óleo de palma refinado através da oxidação acelerada.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CAROTENOIDES

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os carotenoides são pigmentos lipofílicos com ligações duplas conjugadas quase exclusivamente com a configuração *trans*, em contraste com os lipídeos saturados, que têm ligações duplas não conjugadas principalmente de configuração *cis* (SKIBSTED, 2012). Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos formados pela união cauda-cabeça de oito unidades isoprenoides, exceto na posição central. A cadeia poliênica pode ter de 3 a 15 ligações duplas conjugadas, sendo que o comprimento do cromóforo, ou sistema de ligações duplas conjugadas, determina o espectro de absorção e a cor da molécula (FRASER e BRAMLEY, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O esqueleto básico dessas moléculas pode ser modificado através de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeias ou combinações dessas modificações, resultando numa imensa variedade, com mais de 600 estruturas caracterizadas, das quais cerca de 100 têm sido relatadas na natureza (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; FRASER e BRAMLEY, 2004).

Os carotenoides podem ser acíclicos (como o licopeno), monocíclicos (como o γ -caroteno) ou bicíclicos (como o α - e β -caroteno). Os carotenoides hidrocarbonetos são denominados simplesmente de carotenos e aqueles com funções químicas oxigenadas são chamados de xantofilas (Figura 1) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenos, que tem a fórmula geral $C_{40}H_{56}$, ocorrem em várias formas isoméricas, como alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ), sendo os principais o α e β -caroteno (KHOO et al., 2011). O β -caroteno, que ocorre naturalmente com 11 ligações duplas, é de cor laranja, sendo encontrado principalmente na forma de isômeros *all-trans* e, em menor quantidade, como isômeros *cis*, sendo classificados na seguinte ordem: *all-trans* > 9-*cis* > 13-*cis* > 15-*cis*. O *all-trans*- β -caroteno é muito instável, podendo ser facilmente isomerizado quando exposto ao calor e à luz. Desta forma, processamentos de frutas e vegetais podem resultar em significativa isomerização, formando, principalmente, 13-*cis*- β -caroteno. O 9-*cis*- β -caroteno é formado, principalmente, quando o carotenoide é exposto à luz (KHOO et al., 2011).

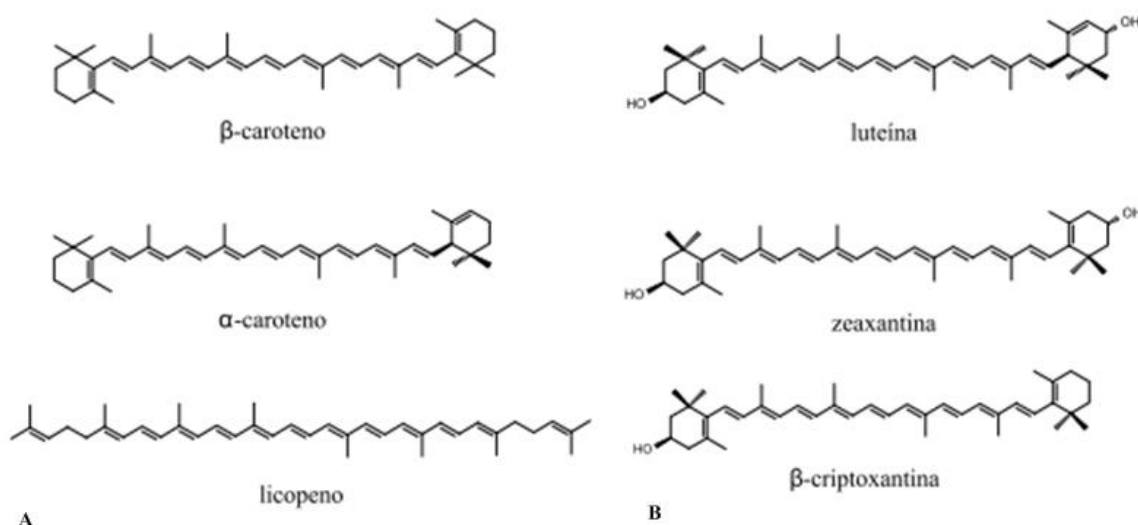


Figura 1 – Exemplos de estruturas químicas dos carotenos (A) e xantofilas (B). Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008).

As xantofilas, produtos de oxidação formados enzimaticamente a partir do α - e β -caroteno, apresentam grupos substituintes com oxigênio, como hidroxilas (ex. β -criptoxantina), grupos ceto (ex. cantaxantina), epóxido (ex. violaxantina) e aldeído (como da β -citraurina), e são mais polares do que os carotenos, sendo que as mais comumente encontradas são a luteína, zeaxantina e criptoxantina (Figura 1). São naturalmente amarelo-alaranjadas, especialmente luteína e zeaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

1.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Além do poder corante, os carotenoides apresentam propriedades funcionais que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos. Muitos dos mesmos têm atividade de pró-vitamina A (β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina, por exemplo), além de atuar na proteção de células contra radicais livres e sequestrar espécies reativas de oxigênio, devido à presença de ligações duplas conjugadas em sua estrutura, sendo, portanto, importantes antioxidantes naturais (KRINSKY, 1994; STAHL e SIES, 2003).

A atividade de pró-vitamina A dos carotenoides é a sua função melhor estabelecida no organismo. Estes são convertidos em retinol através de clivagem oxidativa por β,β -caroteno 15-15' dioxigenase. Esta clivagem também pode ser executada por seres humanos e animais por β,β -caroteno 15,15'-mono-oxigenase, presente no trato intestinal (SAUVANT et al., 2012; FRASER e BRAMLEY, 2004) (Figura 3).

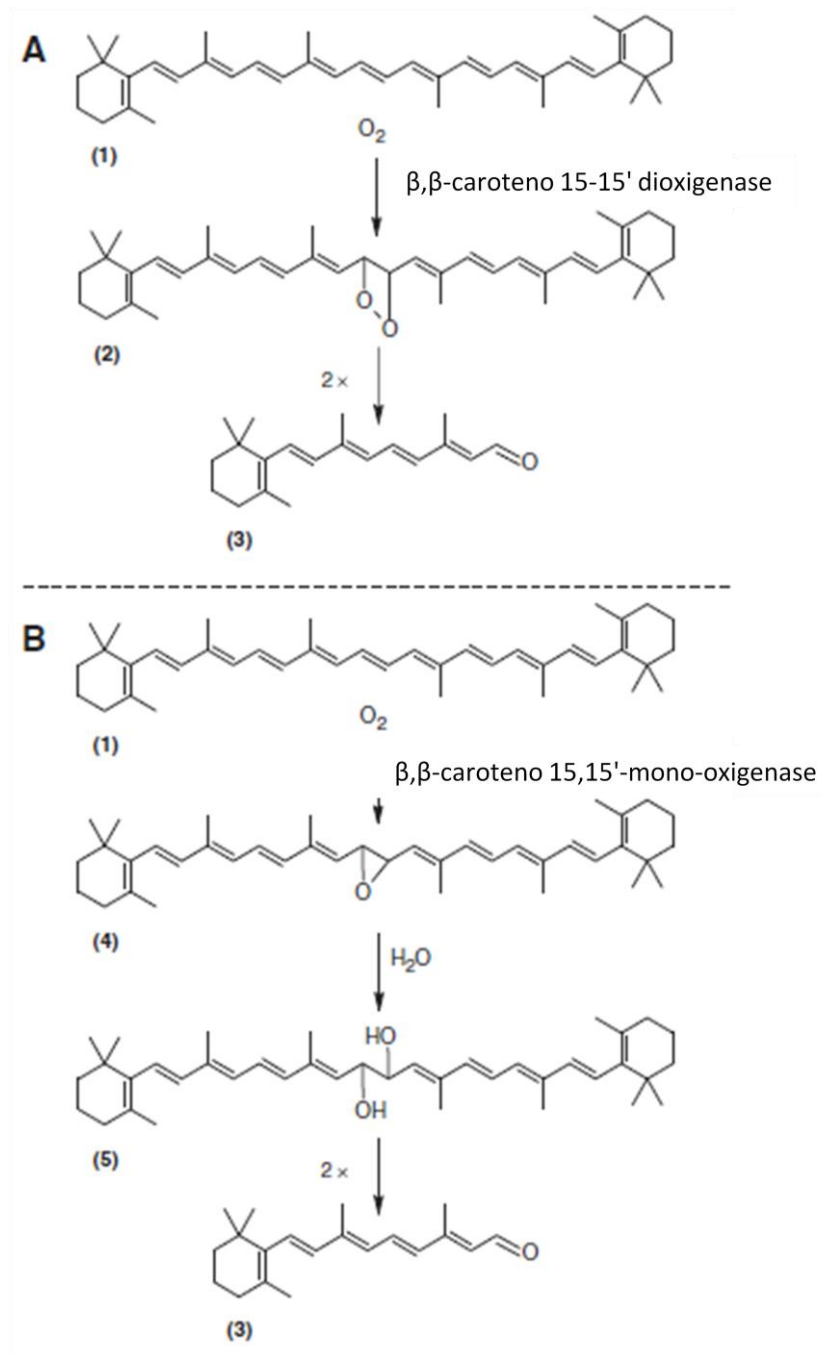


Figura 2 - Reação de β -caroteno (1) para retinol (3) por meio de enzima dioxigenase (2) (painel A); ou por meio de enzima mono-oxigenase (4) e diol intermediários (5) (painel B). A atividade enzimática é realizada sobre a posição central do β -caroteno. Fonte: Fernández-García et al. (2012).

O β -caroteno é o carotenoide de maior potência vitamínica A e ao qual se atribui 100% de atividade, enquanto o α -caroteno e a β -criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008). A eficiência da bioconversão de pró-vitamina A em vitamina A é de seis miligramas de β -caroteno em óleo ou 12 miligramas em alimentos mistos, apresentando a mesma atividade de vitamina A

que um grama de retinol (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; FRASER e BRAMLEY, 2004).

Entre os outros efeitos promotores da saúde relacionados aos carotenoides estão a imunomodulação e redução do risco de contrair doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada à idade, modulação do metabolismo de substâncias cancerígenas, inibição da proliferação celular, realce da diferenciação celular, estimulação da comunicação intercelular e filtragem da luz azul (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; FRASER e BRAMLEY, 2004; FIEDOR e BURDA, 2014).

Um estudo de coorte, realizado por Freedman et al. (2008), demonstrou correlação inversa entre o total de ingestão de frutas e vegetais e risco de câncer de cabeça e pescoço, sendo este 29% menor. Austin et al. (2006), avaliaram se a suplementação de carotenoides podia melhorar a saúde e sobrevivência de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Na análise multivariada, a sobrevivência foi significativa e independentemente melhor naqueles com maiores concentrações basais de caroteno sérico ($p = 0,04$), sugerindo que a suplementação pode melhorar a sobrevida por correção de uma deficiência de micronutrientes, que foi encontrada em 16% dos participantes.

Vale ressaltar que estas atividades fisiológicas não possuem relação com a atividade vitamínica A e têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, mais especificamente à capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (STAHL e SIES, 2003; GAMMONE, RICCONI e D'ORAZIO, 2015) (Figura 4). Entretanto, deve-se levar em consideração que em certos grupos de alto risco (por exemplo, fumantes), pode haver efeitos adversos de altas doses de carotenoides, talvez por causa de suas propriedades pró-oxidantes (LOWE, VLISMAS e YOUNG, 2003; STAHL e SIES, 2003).



Figura 3 – Vias de reações consideradas para eliminação dos radicais oxidantes por carotenoides. Fonte: Skibsted (2012).

A supressão do oxigênio singlete depende da diferença de energia entre o menor orbital molecular desocupado e o maior orbital molecular ocupado e da energia de ionização,

e foi estabelecida uma relação estrutura-atividade quantitativa para essa atividade (SKIBSTED, 2012). Desta forma, a capacidade de supressão do oxigênio do carotenoide é baseada no número de ligações duplas conjugadas, obtendo-se a máxima proteção daqueles que possuem nove ou mais ligações duplas, ressaltando que estudos vêm demonstrando que a natureza do radical é igual ou tem mais importância que a estrutura dos carotenoides (SKIBSTED, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; STAHL e SIES, 2003).

1.3. FONTES ALIMENTARES

Os animais são incapazes de biossintetizar carotenoides, dependendo da alimentação para sua obtenção. Os carotenoides na dieta humana são, principalmente, derivados de plantas, estando localizados nas raízes, folhas, brotos, sementes, frutas e flores. Podem também, apesar de em menor grau, ser ingeridos em ovos de aves de criação doméstica e peixe, que tenham sido alimentados com produtos vegetais ou de algas (FRASER e BRAMLEY, 2004).

Nas plantas fotossintéticas, os carotenoides são encontrados universalmente nos cloroplastos dos tecidos verdes, normalmente associados com proteínas, onde sua cor é mascarada pela presença da clorofila. São também largamente distribuídos em tecidos de plantas não fotossintéticas, localizando-se normalmente nos cromoplastos, depositados em forma cristalina ou como gotículas oleosas, sendo que as xantofilas são frequentemente encontradas esterificadas com ácidos graxos. Por se encontrar associado às proteínas, nos vegetais folhosos os carotenoides têm menor biodisponibilidade, quando comparados aos presentes nas frutas (KHOO et al., 2011).

Os principais carotenoides encontrados em alimentos são: β -caroteno e α -caroteno (abóbora, cenoura, espinafre, milho), β -criptoxantina (pimenta, cajá, nectarina, mamão, pêssego), licopeno (tomate, goiaba vermelha, melancia, mamão vermelho), luteína (espinafre, alface, couve) e violaxantina (manga, pimentão amarelo). Com a exceção de violaxantina, estes carotenoides são também os mais vulgarmente encontrados no plasma humano e foram, em conjunto com a zeaxantina, os mais estudados quanto à promoção de efeitos à saúde (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008).

Os principais carotenoides encontrados em vegetais folhosos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais carotenoides de vegetais folhosos.

Fonte	Principais Carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	Referências
Legumes Suíços comumente consumidos (alface crespa, brócolis, repolho branco, espinafre)	Luteína (4,5-83,2), β -caroteno (2,3-72,8)	Reif et al. (2013)
Porções comestíveis de brócolis e couve-flor	β -caroteno (44,5-86,8), luteína (64,1-120,5), violaxantina (19,9-63,9), neoxantina (36,5-58,7)	Guzman, Yousef e Brown (2012)
Vegetais verdes cozidos (brócolis, escarola, feijão verde e couve)	Neoxantina (5,3-19,2), violaxantina (5,3-15,4), luteína (2,6-69,2), β -caroteno (1,8-59,8)	Sá e Rodriguez-Amaya (2004)
Folhas verdes consumidas em Viçosa-MG (agrião, alface, cebolinha e salsa)	β -caroteno (12,6-52,6), α -caroteno (611,2-1370,5)	Campos et al. (2003)
Acelga	β -caroteno (27 ± 1), α -caroteno ($0,35 \pm 0,04$), luteína (27 ± 1), violaxantina ($9,2 \pm 0,9$)	Costa et al. (2003)

1.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES A PARTIR DE VEGETAIS

Todas as constatações de que os carotenoides têm efeitos benéficos à saúde resultaram em esforços no desenvolvimento de métodos para extrair estes compostos e permitir sua inclusão em alimentos funcionais ou métodos para melhorar a sua biodisponibilidade nos produtos transformados. Assim, os extratos tanto são usados para produzir aditivos e suplementos alimentares, quanto para obter padrões que permitam a quantificação e análise do conteúdo de carotenoides dos alimentos (ISHIDA e CHAPMAN, 2012; ISHIDA E CHAPMAN, 2009).

Na grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre o tema, o enfoque é a análise quantitativa de carotenoides. Para tal, as principais etapas são: (1) extração exaustiva com solventes orgânicos, geralmente acetona, normalmente realizada em equipamentos de pequeno porte, (2) filtração em funil de Büchner, (3) transferência para éter de petróleo através de lavagens com água em funil de separação, (4) saponificação (opcional) e retirada do álcali por lavagem, (5) concentração, (6) separação cromatográfica e (7) quantificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Devido à variedade de fontes e diversidade de carotenoides, não existe método único estabelecido para a extração deste pigmento (PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014). Do ponto de vista industrial, a extração com solventes é a primeira opção, por ser simples e de baixo custo, tornando importante a comparação da eficiência destes para a extração de carotenoides nas diversas fontes vegetais. Apesar disso, são poucos os trabalhos encontrados

na literatura sobre otimização das condições de extração (STRATI e OREOPOULOU, 2011b).

A escolha do solvente é considerada como um dos fatores mais importantes no processo de extração, sendo que a literatura relata como mais usados para produtos alimentícios acetona, éter de petróleo, éter etílico, tetra-hidrofurano (THF), metanol, hexano e diclorometano (PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014). Os solventes utilizados em várias patentes dos Estados Unidos para a extração de licopeno incluem hexano, acetato de etila, cloreto de metileno, metanol, etanol, propanol e acetona, sendo este o mais usado em produtos alimentícios (ISHIDA e CHAPMAN, 2009).

Deve-se também levar em consideração na extração de carotenoides a fonte vegetal, o processamento do material sólido, as técnicas de extração utilizadas, além da influência da temperatura e tempo sobre o rendimento (PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014).

Ao avaliar os efeitos da extração na determinação de luteína em espinafre (liofilizado e não liofilizado), Simonovska et al. (2013) avaliaram diversos solventes (etanol, acetona, etanol-acetato de etila 1:1 (v/v), metanol - tetraidrofurano 1:1 (v/v)), obtendo rendimentos iguais de luteína (8,02 a 9,22 mg/100 g) em extrações de 15 minutos em temperatura ambiente. Os rendimentos foram melhorados com adição de 15 % de acetato de trietilamônio 1M em todos os solventes.

Guzman, Yousef e Brown (2012) desenvolveram um método mais eficiente para extrair e quantificar carotenoides, clorofilas, e tocoferóis nas porções comestíveis de brócolis e couve-flor. Para isso, a amostra liofilizada e triturada foi extraída por três ciclos de 20 minutos em etanol seguidos de centrifugação. O teor de carotenoides totais variou entre $36,5 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ para couve-flor roxa a $367,6 \pm 15,7 \mu\text{g/g}$ para brócolis.

A eficiência de diversos solventes orgânicos para extrair carotenoides de descarte de tomate seco, além do efeito da temperatura, tempo e número de extrações foi avaliada por Strati e Oreopolou (2011a). Três passos de extração, de 30 minutos cada um, foram suficientes para todos os solventes (lactato de etila, acetona, acetato de etila, hexano e etanol), enquanto que o aumento da temperatura (de 25 para 70 °C) geralmente resultou num aumento de rendimento dos carotenoides, sendo o máximo de 243,00 mg/Kg em lactato de etila.

Em trabalho posterior, Strati e Oreopolou (2011b), examinaram misturas de solventes (hexano e acetato de etila), sua proporção para a amostra (pele e sementes de tomate), e o tamanho de partícula dos resíduos para otimizar as condições de extração. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada, de forma a permitir a avaliação do efeito de múltiplas variáveis e as suas interações. As condições otimizadas para a máxima produção de

carotenoides (37,5 mg/kg de resíduo seco) foram de 45% de hexano, a mistura de solvente para a amostra na proporção de 1:9,1 (g/mL) e tamanho de partícula de 0,56 milímetros.

Para estudar os efeitos sobre a extração do licopeno de pele de tomate, Kaur et al. (2008) realizaram um estudo experimental com cinco variáveis independentes. Os valores experimentais de licopeno variaram entre 0,639 e 1,98 mg/100 g, sendo o máximo extraído com relação solvente/amostra de 30:1 mL/g, 4 extrações, temperatura de 50 °C, tamanho de partícula de 0,15 mm e tempo de extração 8 minutos.

Periago et al. (2004) realizaram um estudo experimental para confirmar a hipótese de que as taxas de extração do licopeno a partir de tomate cru, molho e extrato de tomate são uma função do solvente utilizado (hexano, acetona e etanol) durante o processo de extração. Embora o hexano tenha sido o principal solvente utilizado na extração, houve uma interação sinérgica positiva secundária deste com etanol (todas as amostras) e com acetona (amostras de polpa de tomate), o que sugere que a mistura que contém todos os três componentes é essencial para a otimização do processo de extração. O teor de licopeno variou de 0,65-4,72 mg/100 g no tomate cru, 1,06-14,71 mg/100 g no molho no tomate, e 11,47-53,90 mg/100 g na polpa de tomate.

A obtenção de licopeno com 98% de pureza na forma de cristais a partir de amostras de descarte de tomate foi reportada por Nunes e Mercadante (2004), utilizando as seguintes etapas: 1) retirada de água do tomate, com 4 extrações de 30 minutos cada uma com 30 mL de etanol comercial, 2) extração dos carotenoides através de 4 extrações de 120 minutos com acetato de etila e 3) purificação do licopeno através de duas cristalizações com diclorometano/etanol a quente. O teor médio de licopeno obtido foi de $59,2 \pm 21,8 \mu\text{g/g}$.

Kimura e Rodriguez-Amaya (2002) utilizaram acetona como solvente de extração, partição para éter de petróleo e purificação em coluna aberta de MgO/hyflosupercel para isolar padrões de carotenoides de alface, sendo que a pureza variou de 91 a 97% para neoxantina, 95 a 98% para violaxantina, 97 a 100% para lactucaxantina, 92 a 96% para luteína e 90 a 97% para β -caroteno. Os teores de carotenoides obtidos foram de 7,0 $\mu\text{g/g}$ de neoxantina, 17,7 $\mu\text{g/g}$ de violaxantina, 11,7 $\mu\text{g/g}$ de lactucaxantina, 21,9 $\mu\text{g/g}$ de luteína e 22,9 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno.

O número de trabalhos encontrados na literatura sobre a extração de carotenoides em vegetais folhosos é pequena em comparação a outras matrizes alimentícias, como, por exemplo, o tomate (STRATI e OREOPOULOU, 2014). Este número torna-se ainda menor quando são pesquisados estudos sobre a otimização da extração a partir de folhosos.

1.5. COR

A cor influencia diretamente na aparência do alimento, sendo um dos fatores mais avaliados pelos consumidores na escolha destes (PATHARE, OPARA e AL-SAID, 2013). As cores atrativas que os carotenoides proporcionam aos alimentos estão relacionadas ao seu sistema de ligações duplas conjugadas, ou seja, ao tamanho do cromóforo da molécula. Para que a cor amarela seja visível, são necessárias, no mínimo, sete ligações conjugadas. O aumento do número de duplas ligações implica em maiores bandas de absorção e, conseqüentemente, os carotenoides tornam-se mais vermelhos. Dessa forma, há uma relação entre o conteúdo e tipo de carotenoides presente no alimento e a cor que este apresenta (KOOH et al., 2011; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O sistema CIELAB permite a análise da cor a partir dos parâmetros $L^*a^*b^*$. O L^* é uma mensuração referente à luminosidade do objeto a ser avaliado, podendo variar do preto ($L^* = 0$) ao branco ($L^* = 100$). O a^* assume valores positivos para o vermelho e negativos para o verde, enquanto o parâmetro b^* assume valores positivos para amarelo e negativos para azul (PATHARE, OPARA e AL-SAID, 2013) (Figura 5).

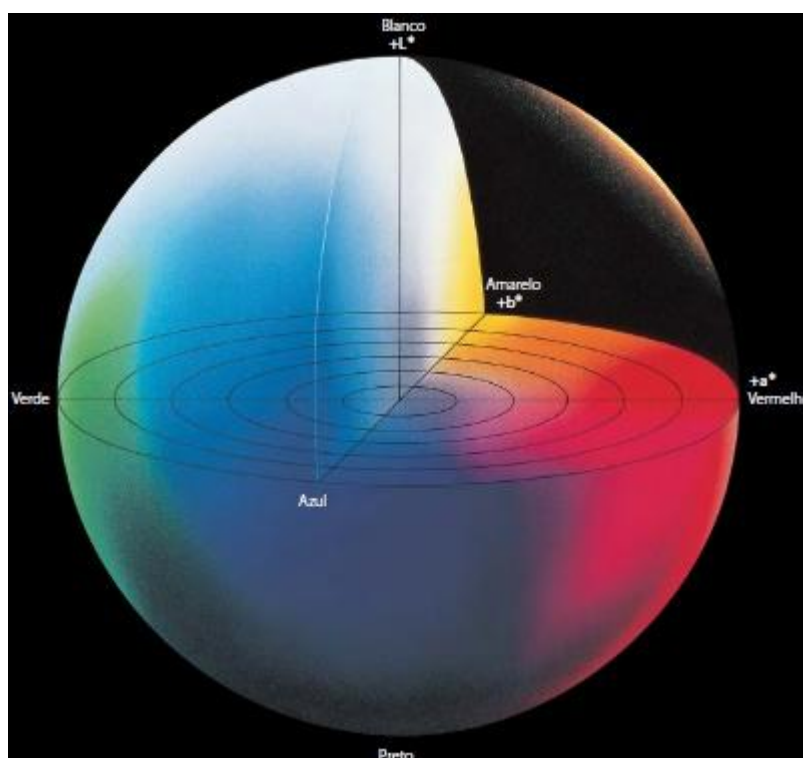


Figura 4 – Espaço de cor CIELAB. Fonte: Konica Minolta (1998).

Nunes e Mercadante (2004) relacionaram os teores de licopeno de amostras de descarte de tomate com os parâmetros de cor CIELAB. O parâmetro a^* foi o que apresentou

maior correlação com a concentração de licopeno (0,84). Meléndez-Martínez et al. (2007) estudaram o comportamento de diversos padrões de carotenoides através do sistema CIELAB. Os carotenoides vermelhos, licopeno e cantaxantina, foram localizados no primeiro quadrante do plano (valores positivos de a^* e b^*), enquanto os demais ficaram no segundo quadrante próximo do eixo b^* (valores negativos de a^* e positivos de b^*), portanto apresentam coloração mais amarelada. Como esperado, o valor de a^* e b^* diminuíram em consequência do decréscimo do número de ligações duplas conjugadas.

1.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS CAROTENOIDES

Os carotenoides têm a ação na prevenção de doenças atribuída à sua atividade antioxidante. Por isso, são numerosos os trabalhos relatando a atividade/capacidade antioxidante de alimentos medidos *in vitro* publicados nos últimos anos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Os ensaios de capacidade antioxidante podem ser classificados, de acordo com as reações envolvidas, em dois tipos: os baseados em reações de transferência de átomo de hidrogênio (HAT), e os baseados em transferência de elétrons (ET) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; GÜLÇİN, 2012; APAK et al., 2013).

Ensaio HAT empregam esquema de reação competitiva, em que antioxidante e substrato competem por peróxilas que são geradas termicamente por meio da decomposição de compostos azo. Exemplos dos ensaios HAT são o de capacidade de absorção de oxigênio radical (ORAC) e o parâmetro total de aprisionamento de radical antioxidante (TRAP) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; GÜLÇİN, 2012; APAK et al., 2013).

Os ensaios baseados em ET medem a capacidade do antioxidante na redução de um oxidante, que muda de cor quando reduzido, sendo o grau de mudança de cor correlacionado com as concentrações de antioxidantes da amostra. São exemplos destes métodos concentrações de fenóis totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox- capacidade antioxidante equivalente (TEAC), poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) e os métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Nenhum destes métodos é considerado universal, sendo que nos alimentos os ensaios mais usados são o ORAC, FRAP, TEAC e DPPH, sendo estes dois últimos muito utilizados devido à simplicidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; APAK et al., 2013).

1.6.1. Atividade antioxidante pelo radical DPPH

O ensaio do DPPH está entre os mais utilizados, pois se encontra entre os mais práticos, rápidos e sensíveis, além de ser de baixo custo e disponível comercialmente. Consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 6) (APAK et al., 2013; RAMADAN, 2010).

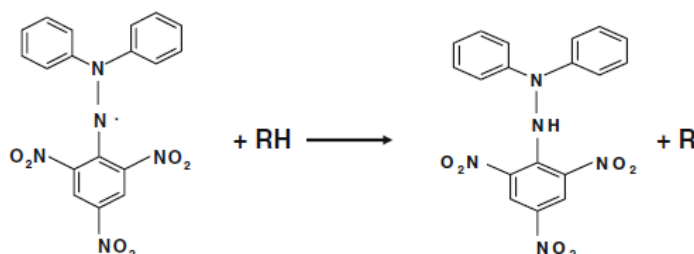


Figura 5 – Estrutura do DPPH e sua redução por um antioxidante. Fonte: Ramadan (2010).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH reduzido pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA et al., 2012).

Fu et al. (2011), ao avaliarem a atividade antioxidante dos principais carotenoides de espinafre (violaxantina, luteína e β-caroteno), concluíram que os resultados estabeleceram o potencial antioxidante destes carotenoides como possíveis responsáveis pela atividade de limpeza de radicais livres desse vegetal na dieta. O β-caroteno foi considerado o mais eficiente na eliminação do radical DPPH, com aproximadamente 75% de inibição, seguido da violaxantina (≅ 60%) e luteína (≅ 50%).

Hernández-Ortega et al. (2012) estudaram a atividade antioxidante de extratos de carotenoides de pimenta seca através do radical DPPH, e a porcentagem de inibição variou de 12,3 a 24,2% a depender da variedade da pimenta estudada (Pimenta guajillo, pimenta pasilla,

e pimenta ancho). Uma possível explicação para a maior atividade antioxidante da pimenta guajillo foi atribuída à maior quantidade de β -caroteno e criptoxantina na mesma, indicando que essa atividade é influenciada pelo tipo e quantidade de carotenoides.

1.6.2. Atividade antioxidante pelo radical ABTS

O método de rastreio de atividade antioxidante com ABTS é um ensaio de descoloração aplicável tanto a antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, como flavonoides, carotenoides e plasma. O radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^+) é formado por oxidação com agentes oxidantes, geralmente persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), que será reduzido na presença de antioxidantes (RE et al., 1999; APAK et al., 2013) (Figura 7).

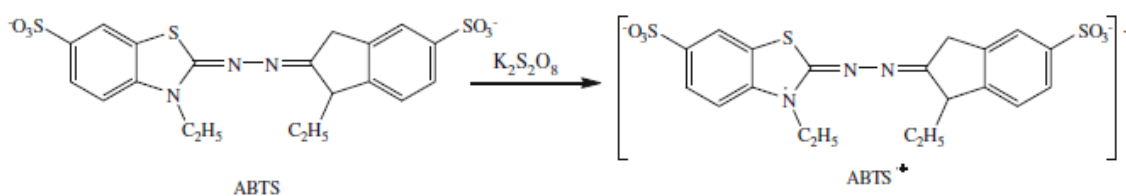


Figura 6 – Oxidação do ABTS com $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e geração do ABTS^+ . Fonte: Gülçin (2012).

O radical formado após a reação tem cor azul e absorve luz a 734 nm. A adição do antioxidante reduzirá o cátion formado, gerando descoloração da solução, que é monitorada espectrofotometricamente. O grau desta descoloração, conseqüentemente da resposta final, será função do tempo de incubação e concentração do antioxidante, e é calcula em relação à reatividade de Trolox como um padrão, sob as mesmas condições. Por isso, esse ensaio é frequentemente referido como ensaio de capacidade equivalente ao Trolox (TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity) (APAK et al., 2013).

A vantagem do teste ABTS consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. Entretanto, uma das limitações é ser dependente do tempo de incubação, já que divergências nos resultados podem ser atribuídas ao tempo de reação do radical com o antioxidante (APAK et al., 2013). Bohm et al. (2002) estudaram a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox de isômeros de α -caroteno, β -caroteno, licopeno e zeaxantina. Os valores de TEAC variaram de 0,5 a 3,1 mmol/L. Três isômeros *cis* não identificados de licopeno demonstraram maior atividade antioxidante que o *all-trans*-

licopeno, que foi aproximadamente duas vezes maior que a atividade antioxidante dos isômeros de β -caroteno.

Prasad et al. (2011) utilizaram o ensaio de redução do ABTS para avaliação do poder antioxidante dos carotenoides extraídos da pele, polpa e semente do fruto de *Canarium odontophyllum*. Como resultado, os pigmentos que apresentaram maior correlação com a atividade de redução do ABTS foram o β -caroteno e seus isômeros, quando comparado à luteína, exercendo as maiores atividades antioxidantes no ensaio, que variaram de 18,3 a 44,5% na polpa, a depender da concentração de carotenoides.

1.6.3. Estabilidade oxidativa em Rancimat

Esse teste é baseado na determinação do tempo necessário (tempo de indução) para um determinado óleo ou gordura entrar na fase exponencial (quando o grau de oxidação aumenta abruptamente) do processo de oxidação. Esse tempo é determinado medindo a condutividade da água deionizada, na qual vai borbulhando ar que passa pela amostra de óleo aquecido a uma temperatura específica, arrastando consigo os compostos voláteis resultantes do processo de oxidação (Figura 8).

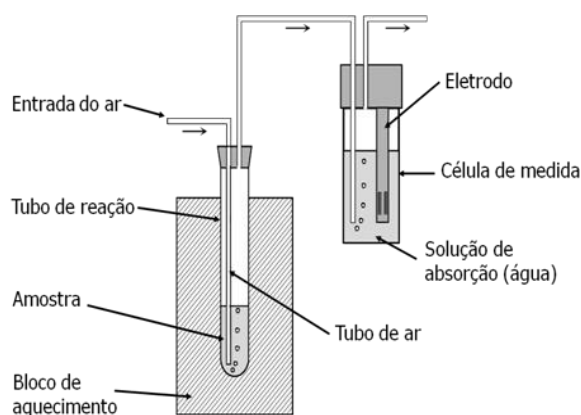


Figura 7 – Representação esquemática do funcionamento do Rancimat. Fonte: Metrohm (2009).

Arranz et al. (2008) estudaram a possível relação entre os valores de capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH) e da estabilidade oxidativa (método Rancimat) em diferentes óleos (avelã, amendoim, pistache, nozes e amêndoas), encontrando uma correlação significativa entre os dois ($r^2 = 0,83$, $p = 0,032$). Os autores deixam claro que, embora uma comparação direta não seja possível, pois eles se concentram em diferentes aspectos da capacidade antioxidante de óleos, esta correlação positiva indica que seria possível supor que,

para um determinado lote de amostras, o ranking de capacidade antioxidante proporcionada pelos dois ensaios seria semelhante.

Os lipídeos, por serem constituídos de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias oxidáveis, são altamente suscetíveis à oxidação, seja por via hidrolítica, oxidação enzimática, fotoxidacão ou autoxidação, sendo esta última a principal. Para inibir ou retardar esses processos, são utilizados os antioxidantes (RAMALHO e JORGE, 2006).

Dentre os antioxidantes sintéticos mais usados em alimentos, está o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), geralmente considerado o mais eficaz, principalmente em óleos vegetais, pois resiste ao calor, não altera o sabor ou o cheiro do material e pode ser utilizado em menor concentração. Entretanto, apesar da eficácia, estudos toxicológicos têm demonstrado que esses antioxidantes podem apresentar efeitos carcinogênicos, o que impulsiona ainda mais a busca de compostos naturais que possam ser usados como antioxidantes, reduzindo o uso dos sintéticos (RAMALHO e JORGE, 2006).

Considerando que os carotenoides atuam como antioxidantes primários, inativando os radicais livres, ou secundários, suprimindo o oxigênio singlete, estes seriam uma alternativa de antioxidante natural para adição em alimentos, como, por exemplo, o óleo de palma refinado, que perde os carotenoides naturalmente presentes durante o processo de refino.

Neste sentido, o trabalho de Mendonça (2014) avaliou, em Rancimat, a estabilidade oxidativa de óleo de palma refinado adicionado de antioxidante sintético TBHQ comparada à estabilidade do óleo adicionado de extrato de carotenoides obtido a partir da microalga *Spirulina platensis*. Os tempos de indução das amostras variaram de $7,86 \pm 0,42$ h a $9,00 \pm 0,02$ h para os óleos de palma sem acréscimo de antioxidante, de $14,15 \pm 0,05$ h a $14,85 \pm 0,46$ h, para os óleos com TBHQ e de $10,43 \pm 0,30$ h a $14,33 \pm 0,52$ h para os óleos adicionados do extrato de carotenoides, não sendo verificada diferença estatística entre os resultados obtidos para as amostras com TBHQ e com o extrato de carotenoides, indicando que esse apresenta potencial para aplicação como antioxidante de óleo de palma refinado.

Zeb e Murcovic (2010, 2011, 2013a, 2013b), ao utilizarem o Rancimat para analisar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais adicionados de β -caroteno ($300 \mu\text{g/g}$) verificaram que a concentração deste diminuiu em função do tempo de aquecimento, sendo degradado nas primeiras horas (3-5 horas) de tratamento térmico. Quando comparada a estabilidade do β -caroteno e da astaxantina ($300 \mu\text{g/g}$) em azeite de oliva, esta foi degradada mais lentamente (ZEB e MURCOVIC, 2011).

Os óleos vegetais utilizados nos experimentos acima foram mais estáveis durante o tratamento térmico na presença de β -caroteno quando o mesmo apresentava em sua composição outras substâncias, tais como: tocoferóis, ácido oléico, compostos fenólicos, dentre outras, visto que podem atuar sinergicamente com este pigmento retardando a oxidação lipídica. Além disso, deve ser levada em consideração a composição em ácidos graxos dos óleos vegetais estudados.

2. DESCARTE DE VEGETAIS

O setor agrícola brasileiro destaca-se como um dos mais importantes da economia, apresentando recordes de safras. Neste cenário de produção de alimentos, entretanto, o Brasil também tem sido consagrado como um campeão em perdas pós-colheita e desperdícios (VILELA, LANA e MAKISHIMA, 2003; TOFANELLI et al., 2009; BRASILIA, 2009). Especificamente no caso das hortaliças, estudos realizados constataam que no Brasil os níveis médios de perdas pós-colheita são de 35%, chegando a atingir até de 40%, enquanto em outros países como nos Estados Unidos não passam de 10% (VILELA, LANA e MAKISHIMA, 2003; BRASÍLIA, 2009).

Um alerta feito durante a realização do Fórum Green Global Growth, em Copenhague, capital da Dinamarca, em outubro de 2013, divulgou que 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são jogadas no lixo. Um prejuízo de US\$ 750 bilhões, equivalentes a mais de R\$ 1,6 trilhão (GRAYLEY, 2013). As perdas de alimentos acontecem em estágios de produção, pós-colheita e processamento da cadeia de abastecimento alimentar. As perdas pós-colheita podem ser definidas como aquelas que ocorrem após a colheita em virtude da falta de comercialização ou do consumo do produto em tempo hábil, sendo esta classificada como desperdício de alimentos (FAO, 2011).

Essas perdas, apesar da tecnologia aplicada a fim de manter a qualidade, segurança alimentar e também reduzir perdas qualitativas e quantitativas entre a colheita e consumo, podem ocorrer em número expressivo e representar gasto de recursos valiosos e escassos utilizados na produção, como água e energia. Produzir alimentos que não são consumidos leva a emissões desnecessárias de dióxido de carbono, além de perda do valor econômico dos alimentos produzidos (FAO, 2011). A Figura 9 ilustra as perdas de frutas e vegetais nos diversos estágios, da produção ao consumo, em diferentes regiões do mundo.

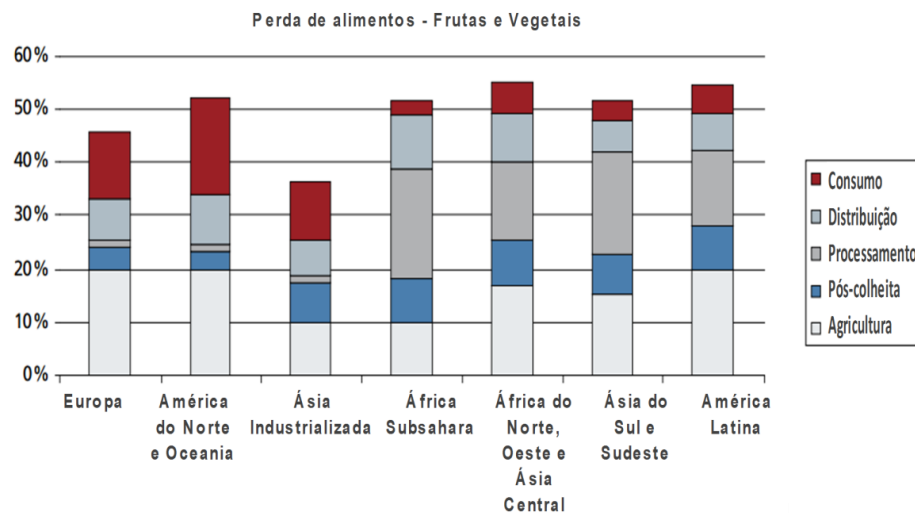


Figura 8 – Distribuição (%) da produção inicial perdida ou desperdiçada em diferentes fases da cadeia de fornecimento alimentar para frutas e vegetais, em diferentes regiões do mundo. Fonte: FAO (2011).

Os alimentos são desperdiçados, quando, em boas condições fisiológicas, são desviados do consumo para o lixo. Esse desperdício pode acontecer através da sobra de alimentos nos pratos após as refeições domiciliares e em restaurantes, pelo descarte dos produtos *in natura* com boas condições físicas, vencimento do prazo de validade e, até mesmo pela falta de outras formas alternativas de aproveitamento (VILELA, LANA e MAKISHIMA, 2003).

Na Figura 10 estão apresentadas perdas de alguns vegetais folhosos de uma empresa atacadista do Centro de Abastecimento da Bahia (CEASA) localizado na região metropolitana de Salvador, Bahia. O período de perdas compreendido no gráfico é de cinco meses (outubro de 2013 a fevereiro de 2014). Neste período, é possível observar, além da perda do alimento, impróprio para ser comercializado e consumido, e da perda financeira, a possibilidade do uso destes descartes para obtenção de compostos naturais de alto valor agregado, como é o caso dos carotenoides.

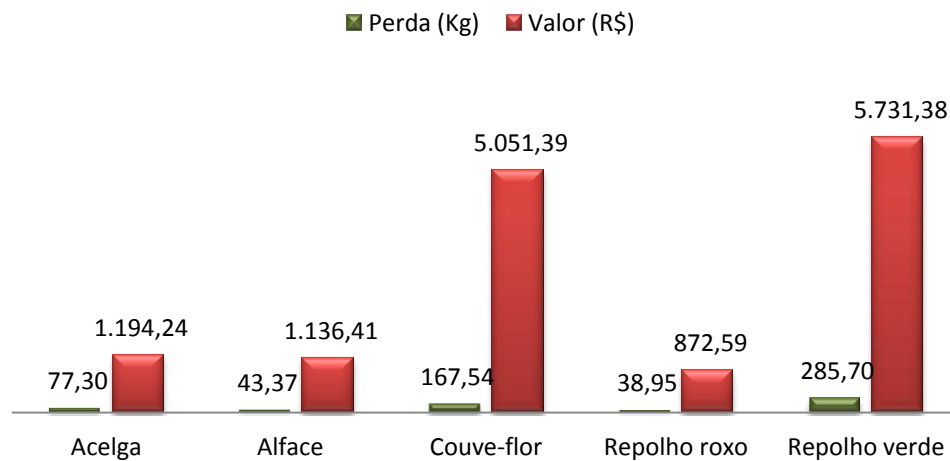


Figura 9 – Perda de vegetais folhosos durante período de cinco meses de empresa atacadista de frutas e hortaliças na CEASA, localizada na Região Metropolitana de Salvador, no Estado da Bahia.

Diante da constatação das perdas pós-colheita de frutas e hortaliças na horticultura brasileira, e de que os resíduos de vegetais podem conter muitas substâncias reutilizáveis de alto valor, tais como o β -caroteno e a luteína, com importante função nutricional na dieta humana, são imprescindíveis estudos para obtenção de carotenoides a partir dessas fontes.

3. REFERÊNCIAS

- APAK, R. et al. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, p.5, p. 957–998, 2013.
- ARRANZ, S. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**, v. 110, p. 985–990, 2008.
- AUSTIN, J. et al. A community randomized controlled clinical trial of mixed carotenoids and micronutrient supplementation of patients with acquired immunodeficiency syndrome. **European Journal of Clinical Nutrition** v. 60, p. 1266– 1276, 2006
- BOHM, V. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221-226, 2002.
- BRASILIA, D. C. Fome e desperdício de alimentos. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&id=1256:reportagens-materias&Itemid=39>. Acesso em: 15 de outubro de 2013.
- CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P.; Teores de beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 163-169, 2003.
- COSTA, S. M. Caracterización de acelga fresca de santiago del estero (argentina). comparación del contenido de nutrientes en hoja y tallo. evaluación de los carotenoides presentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 23, n. 1, p. 33-37, 2003.
- FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Global food losses and food waste: extent, causes and prevention**. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Roma, 2011.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. et al. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International** v. 46, p. 438–450, 2012.
- FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients** v. 6, p. 466-488, 2014
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.
- FREEDMAN, N. D. et al. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 122, p. 2330–2336, 2008.
- FU, H. et al. Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 288–297, 2012.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? **Food & Nutrition Research**, v. 59, p. 26762, 2015.

GRAYLEY, M. V. FAO quer que mundo monitore desperdício de alimentos. 2013. Notícias e Mídia: Rádio ONU. Disponível em:

<http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2013/10/fao-combate-a-fome-passa-por-monitoramento-de-desperdicio-de-alimentos/>. Acesso em 24 de novembro de 2013.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.

GUZMAN, I.; YOUSEF, G. G.; BROWN, A. F. Simultaneous Extraction and Quantitation of Carotenoids, Chlorophylls, and Tocopherols in Brassica Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7238–7244, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, M. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum L.*). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 10p., 2012.

ISHIDA, B. K.; CHAPMAN, M. H. Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 1051-1059, 2009.

ISHIDA, B. K.; CHAPMAN, M. H. Effects of a hydrodynamic process on extraction of carotenoids from tomato. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1156–1160, 2012.

KAUR, D. et al. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 711-718, 2008.

KHOO, H. et al. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1710-1738, 2011.

KIMURA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, 78: 389-398, 2002.

KONICA MINOLTA. **Comunicação precisa da cor**: controle de qualidade da percepção à instrumentação. Seoul: Konica Minolta, 1998. 59p. Disponível em: <www.konicaminolta.com/sensingusa/support/product_applications>. Acesso em: 15 de novembro de 2013.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

LOWE, G. M.; VLISMAS, K.; YOUNG, A.J. Carotenoids as prooxidants? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 363-369, dez. 2003.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145-1150, 2007.

MENDONÇA, T. A.; **Carotenoides da microalga *Spirulina platensis*: obtenção e avaliação da atividade antioxidante** (Dissertação). Salvador: Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2014.

METROHM AG. **743 Rancimat Manual**. Switzerland, 2009.

NUNES, I. L., MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 440-447.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36–60, 2013.

PERIAGO, M. J. et al. Mixture approach for optimizing lycopene extraction from tomato and tomato products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5796-5802, 2004.

PRADO, J. M.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, A. A. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables – Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 29-66, 2014.

PRASAD, K. N. et al. Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1549–1555, 2011.

RAMADAN, M. F. Rapid antiradical method for screening deep fried oils. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, p. 47-50, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RÉ, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REIF, C. et al. Carotenoid database of commonly eaten Swiss vegetables and their estimated contribution to carotenoid intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 64–72, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 2001, p.64.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 726–740, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenóides**: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 99 p.

SA, M. ; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables - Comparison of analytical and calculated data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n.1, p. 37-51, 2004.

SAUVANT, P. et al. Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. **Food Research International** v. 46, n. 2, p. 469–479, 2012.

SIMONOVSKA, B; VOVK, I; GLAVNIK, V.; CERNELIC, K. Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. **Journal of Chromatography A**, v. 1276, p. 95– 101, 2013.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2409–2417, 2012.

SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381–386, 2012.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345-51, 2003.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 23–29, 2011a.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 747–752, 2011b.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. **Food Research International**, v. 65, p. 311–321, 2014.

TOFANELLI, M. B. D. et al. Levantamento de perdas em hortaliças frescas na rede varejista de Mineiros. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.1, 2009.

VILELA, N.J.; LANA, M.M.; MAKISHIMA, N. O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 21, n. 2, p. 141-143, 2003.

ZEB, A.; MURKOCIC, M. Pro-oxidant effects of β -carotene during thermal oxidation, of edible oils. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 90, p. 881-889, 2013a.

ZEB, A.; MURKOCIC, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of β -carotene in corn oil triacylglycerols. **Food Research International**, v. 150, p. 534-544, 2013b.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1584-1593, 2011.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Characterization of the effects of β -carotene on the thermal oxidation of triacylglycerols using HPLC-ESI-MS. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1218-1228, 2010.

CAPÍTULO II

ARTIGO I: MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS: REVISÃO

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS: UMA REVISÃO

Renata L. Nascimento^{a,*}, Itaciara L. Nunes^a

^aEscola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, 40110-090 Salvador - BA, Brasil

Devido aos efeitos benéficos dos carotenoides na saúde humana, há um interesse crescente na extração destes compostos em matrizes vegetais. Entretanto, por não existir um método único para a extração, são inúmeros os estudos encontrados sobre o assunto. A extração convencional por solvente e baixa pressão ainda é o método mais utilizado, mas o uso de técnicas para aprimorar o processo, principalmente buscando menor gasto de solventes orgânicos, tem se destacado. Entre estas, estão a extração assistida por micro-ondas (MAE), assistida por ultrassom (UAE), sob alta pressão (PLE) e com fluido supercrítico (SFE). Todas as técnicas devem ser analisadas antes do uso, por serem dependentes da matriz, do tipo de carotenoide presente, dos tratamentos da amostra, entre outros fatores, podendo, muitas vezes, serem usadas em conjunto.

Palavras-chave: obtenção; quantificação; carotenoides; técnica analítica.

INTRODUÇÃO

Os carotenoides são uma classe de pigmentos lipossolúveis presentes em organismos fotossintéticos e são os maiores responsáveis pelas cores amarela a vermelha dos vegetais.^{1,2} Além do poder corante e atividade de pró-vitamina A, os carotenoides atuam na proteção de células contra radicais livres e no sequestro de espécies reativas de oxigênio, devido à presença de ligações duplas conjugadas em sua estrutura, sendo, portanto, importantes antioxidantes naturais.^{3,4}

Atribuídas às suas propriedades antioxidantes, estão a imunomodulação e redução do risco de contrair doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada à idade, entre outras.⁴⁻⁸ Essas propriedades fazem com que a utilização dos carotenoides em suplementos dietéticos e alimentos processados seja desejável.^{9,10} Segundo o Relatório do Mercado Global de Carotenoides, a Companhia de Comunicações Empresarial (BCC Research) estimou que o valor do mercado mundial de carotenoides utilizados comercialmente foi cerca de US \$ 1,2 bilhão em 2010, com uma chance de crescer para US \$ 1,4 bilhões em 2018, com uma taxa de crescimento anual composta de 2,3%.¹¹

Dessa forma, há uma exigência do mercado por uma busca constante de novas fontes e métodos de extração, que obtenham o máximo de rendimento ao mesmo tempo em que preservem as características biológicas e químicas desses compostos. Uma alternativa que vem sendo explorada por diversos estudos é a extração de carotenoides a partir de resíduos de vegetais, que apresentam-se como fonte de substâncias reutilizáveis, tais como o β -caroteno, o licopeno e a luteína, sendo necessário, para isso, uma tecnologia adequada que converta essa matéria residual em produtos comerciais de alto valor.¹²⁻¹⁵

Durante a extração dos carotenoides, deve-se levar em consideração que no tecido intacto dos vegetais há maior proteção contra a oxidação dos mesmos, entretanto, com a ruptura dos tecidos há um aumento da sua suscetibilidade aos fatores pró-oxidantes. Além disso, devido à variedade de fontes e diversidade de carotenoides, não existe método único estabelecido para a extração deste pigmento, tornando a extração quantitativa e a obtenção de carotenoides a partir de fontes naturais, bem como sua purificação, bastante estudadas.¹⁶ Apesar da extração com solventes ser a mais utilizada, é crescente a demanda por métodos que sejam mais rápidos, eficientes e utilizem menor quantidade de solventes.

Esta revisão de literatura apresenta e discute trabalhos publicados nos últimos quinze anos, e que tiveram por finalidade realizar extração quantitativa e/ou otimizar métodos diversos para

extração/obtenção de carotenoides a partir de diversas fontes vegetais, assim como realizar a caracterização/análise quantitativa desses pigmentos.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM ALIMENTOS

A busca de artigos reportando métodos de extração de carotenoides a partir de fontes vegetais foi realizada nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus*, *Science Direct*, *International Information System for the Agricultural Science and Technology* (AGRIS), *National Agricultural Library Catalog e Food Science and Technology Abstracts* (OVID), utilizando-se a combinação dos descritores *carotenoids extraction*, *vegetables* e *carotenoids quantification*.

Foram excluídos artigos de revisão e que não utilizassem vegetais como matriz para extração dos carotenoides. Os estudos tiveram suas informações sumarizadas em tabelas contendo os itens: autor, matriz, objetivo, metodologia utilizada e principais resultados encontrados.

A análise de carotenoides, de forma geral, engloba uma série de etapas desde a amostragem até a quantificação, sendo a extração de grande importância pela sua influência nos passos seguintes. As etapas de amostragem e preparo da amostra devem ser adaptadas ao propósito da análise, natureza da matriz e carotenoides a serem extraídos, assim como do método de extração que será utilizado. A partição é geralmente realizada para remoção da água remanescente no extrato e transferência deste para um solvente compatível com as análises posteriores. A saponificação é um meio efetivo de remover clorofilas e lipídeos, etapa que pode ser dispensada a depender da matriz. A separação cromatográfica seguida da identificação e quantificação é, em alguns estudos, o objetivo principal da análise (Figura 1).

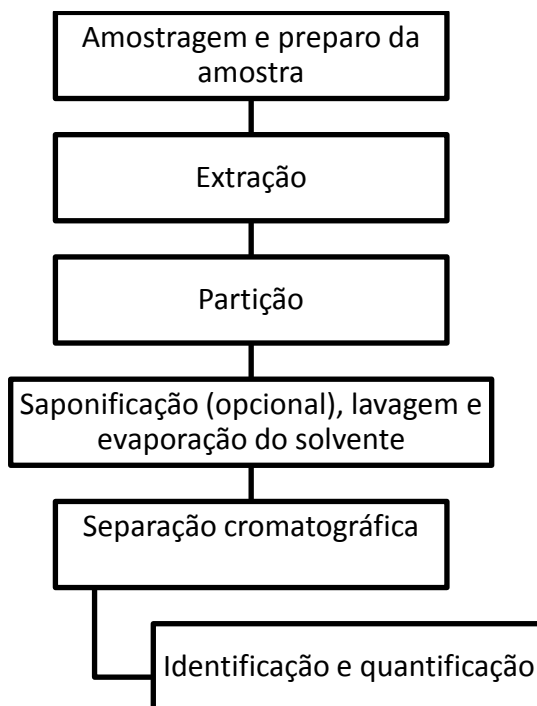


Figura 1 – Principais etapas em análise de carotenoides. Adaptado de Rodriguez-Amaya e Kimura ¹⁷

Há uma grande diversidade de estudos sobre a determinação de carotenoides atualmente disponíveis, e os mesmos utilizam diferentes matrizes, métodos de extração, de quantificação e de avaliação dos extratos obtidos. Entretanto, esses estudos têm diferentes focos: atingir condições melhoradas de obtenção/extração de carotenoides a partir de determinada metodologia, como nos estudos em que são realizados planejamentos experimentais, totalizando vinte e dois dos estudos aqui apresentados; aprimorar metodologias de quantificação/identificação de carotenoides, como em dois dos estudos; e caracterizar por extração quantitativa o perfil de carotenoides de determinada matriz ainda pouco conhecida, ou que necessite de novos estudos, sendo aqui apresentados seis destes estudos.

Não existe um método único estabelecido para a extração de carotenoides, ^{16,18,19} entretanto, do ponto de vista industrial, a extração com solventes é a primeira opção, por ser simples e de baixo custo, tornando importante a comparação da eficiência destes para a extração de carotenoides nas diversas fontes vegetais. ²⁰ As técnicas mais utilizadas e estudadas para extração de carotenoides atualmente são as de extração por solvente, que envolvem calor e/ou agitação, e extração com fluido supercrítico. A extração por solvente sob baixa pressão (LPSE) é mais usada tradicionalmente. ¹⁶

Extração convencional

A maioria dos métodos de extração envolvem a libertação dos componentes desejados a partir da perturbação do tecido das matrizes e posterior remoção para o solvente de extração.¹⁹ Convencionalmente, diversos solventes vêm sendo usados para extrair carotenoides, como diclorometano, clorofórmio, tetra-hidrofurano, hexano, éter de petróleo, éter dietílico, diclorometano, acetona, acetato de etila, isopropanol e metanol.^{16,21}

Para escolha do solvente a ser utilizado alguns critérios são priorizados: custo, toxicidade e solubilidade dos carotenoides no solvente. Geralmente os carotenoides esterificados são extraídos com solventes apolares (hexano), enquanto as xantofilas são extraídas com solventes polares (etanol e acetona).²² O uso de solventes vem sendo discutido na maioria dos artigos publicados sobre a extração de carotenoides.^{19,23} Essas discussões são provenientes das limitações do governo de diversos países ao uso destes, em conjunto com a preocupação da população em geral com a prevenção da saúde e preservação do meio ambiente.

Os solventes utilizados em várias patentes dos Estados Unidos para a extração de licopeno incluem hexano, acetato de etila, cloreto de metileno, metanol, etanol, propanol e acetona, sendo este o mais usado em produtos alimentares.⁹ Nos estudos de extração convencional citados nesta revisão os mais utilizados foram acetona, metanol, etanol e hexano, respectivamente.

Deve-se também considerar a suscetibilidade dos carotenoides à oxidação durante o processo de extração por solventes, por encontrarem-se em solução, tornado-se mais sensíveis à luz, calor, ácido ou exposição ao oxigênio, o que promove sua degradação.¹⁹ O oxigênio, principalmente na presença de luz e calor, é altamente destrutivo, levando a formação de artefatos, como epóxi-carotenoides e apocarotenoides. A exposição à luz induz a fotoisomerização *trans-cis* e a fotodestruição dos carotenoides. Já na presença de ácidos, os carotenoides podem decompor, desidratar, ou isomerizar, sendo a maioria estável sob condições alcalinas.¹⁷

Nesse sentido, a extração por solventes com baixa pressão (LPSE) apresenta desvantagens relacionadas ao uso de altas temperaturas, ao elevado consumo de solventes, elevado tempo de extração, consumo de energia, custo e, conseqüentemente, trabalho.¹⁶

Como forma de adequar-se às atuais exigências relacionadas ao consumo de solvente, saúde e meio ambiente, grande parte dos estudos busca otimizar as condições de extração, ou seja, obter o maior rendimento possível com menor tempo e gasto de reagentes, assim como com

menor degradação dos carotenoides e utilizando solventes geralmente reconhecidos como seguros (Generally Recognized as Safe – GRAS), como lactato de etila e etanol.

Alguns artigos sobre extração de carotenoides que usam metodologias tradicionais estão disponíveis na Tabela 1. Dentre eles, estão os artigos de quantificação, que realizaram caracterização/investigação da matriz (6), ^{25,26,27,30,31,34} que aprimoraram o método de quantificação (2), ^{28,29} e os de obtenção (7). ^{9,23,24,32,33,35,36}

Tabela 1. Métodos de extração de carotenoides por extração convencional em fontes vegetais

(continua)

Matriz	Objetivo	Método de extração/quantificação: amostra (a); diâmetro (d); relação massa:solvente (m:s); solvente (s); tempo (t); temperatura (T); número de extrações (n); quantificação (q)	Conteúdo do extrato de carotenoides	Referência
Resíduos do processamento de tomate	Usar resíduos de tomate como potencial fonte de carotenoides bioativos.	Solvente e agitação. a = 10 g de resíduo de tomate seco; s = 160 mL de hexano; t = 10 min; n = 3; q = CLAE	Licopeno = 6,34 – 15,69 mg/g β-caroteno = 2,73 – 11,95 mg/g	24
Folhas de manjeriço, coentro, <i>choy sum</i> (repolho chinês), e folha de batata doce cozidas.	Investigar os efeitos da água de cozimento sobre as mudanças no conteúdo total de carotenoides, teor de fenólicos totais, e capacidade antioxidante total em vegetais ricos em carotenoides.	Solvente e agitação. a = 10g de amostra homogeneizada; s = 120 mL de etanol; t = 10 min; n = 4; q = CLAE	Carotenoides totais = 35 – 85 µg/g	25
Folhas verdes <i>Brassica</i>	Pesquisar ampla variedade de cultivares verdes japoneses diferentes em classificação botânica, mas cultivadas em condições idênticas, e analisadas com um único método analítico.	Solvente e agitação. a = 5 g de pó congelado; s = 60 mL de metanol e acetona – 1:1 com 50 mL de 2,6-ditert-butil-metilfenol por litro; t = 30 s; q = CLAE	Luteína = 3,8 – 10,5 mg/100g β-caroteno = 2,1 – 6,8 mg/100g	26
Vegetais comumente consumidos na Suíça	Produzir dados de carotenoides para diferentes cultivares de vegetais, identificados por sua classificação botânica, através de técnica analítica simples.	Solvente e agitação. a = 5 g de pó congelado; s = 60 mL de metanol e acetona – 1:1 com 50 mL de 2,6-ditert-butil-metilfenol por litro; t = 30 s; q = CLAE	Luteína = 0,2 – 13 mg/100g β – caroteno = 0,2 – 8 mg/100g	27

(continua)

Espinafre	Esclarecer a influência de um número de fatores na determinação do teor de luteína no espinafre.	Solvente e agitação. Liofilizado: a = 10 g; s = 10 mL de etanol, acetona, etanol-acetato de etilo a 1: 1 e metanol-THF a 1: 1 (15% de TEAA em cada solvente e mistura de solvente); t = 15 min; q = CLAE Não liofilizado: a = 100 g; s = 10 mL de acetona (adição de diferente porcentagem de água, 1 M de TEAA (pH 7) ou 1 M TEAA (pH 7) e 0,5 m NaCl); t = 15 min; q = CLAE	luteína = 0,79 – 9,22 mg/100g	28
Brócolis e couve-flor	Oferecer um novo método, mais rápido e preciso do que os métodos descritos anteriormente, para extrair e analisar simultaneamente carotenoides, clorofilas, e tocoferóis de vegetais <i>Brassica</i> .	Solvente e agitação. a = 0,2 g liofilizada; s = 5 mL de etanol; t = 20 min; n = 3; q = CLAE	Carotenoides totais = 36,5 – 367,6 µg/g Luteína = 64,1 – 120,5 µg/g β – caroteno = 44,5 – 86,8 µg/g Violaxantina = 19,9 – 63,9 µg/g Neoxantina = 36,5 – 58,7 µg/g	29
Araçá	Caracterizar os níveis de carotenoides no fruto maduro e determinar mudanças qualitativas no perfil de carotenoides por estágio de maturação.	Solvente e agitação. a = 0,25 g de casca e polpa liofilizadas; s = 5 mL de metanol seguido de 5 mL de hexano/acetona (1: 1); t = 12 min; n = 5; q = CLAE	Carotenoides totais = 806 e 2484 µg/100 g Luteína = 154 e 756 µg/100 g α – caroteno = 31 e 96 µg/100 g β – caroteno = 44 e 143 µg/100 g zeaxantina = 17 e 144 µg/100 g	30
Pimenta seca	Avaliar o conteúdo de carotenoides de três	Solvente e maceração. a = 1 g de pimenta seca; s = 20 mL de acetona; q = CLAE e	Carotenoides totais = 1437 – 3406 µg/g	31

(continua)

	variedades de pimenta seca mexicana e determinar atividade antioxidante e efeito analgésico e anti-inflamatório.	espectrofotômetro	β – caroteno = 47,7 – 344,0 $\mu\text{g/g}$ β – criptoxantina = 185,6 – 407,2 $\mu\text{g/g}$ Violaxantina = 746,2 – 3667,2 $\mu\text{g/g}$	
Resíduos do processamento de tomate	Examinar misturas de solventes e otimizar as condições de extração.	Solvente e agitação. a = 10 g de resíduo de tomate seco e homogeneizado; d = 0,5, 075 e 1,0 mm; m:s = 1:3, 1:6,5 e 1:10 g/mL; s = mistura hexano e acetato de etila (10, 45 e 80%); t = 30 min; T = 25° C; q = espectrofotômetro	Carotenoides totais = 6,1 – 36,5 mg/Kg	23
Resíduos do processamento de tomate	Investigar a extração de licopeno em diferentes solventes orgânicos e avaliar a influência das condições de extração.	Solvente e agitação. a = 20 g de resíduo de tomate seco homogeneizado; m:s = 1:10 g/mL ; s = 200 mL de hexano, etanol, acetato de etila e lactato de etila; t = 5-40 min; T = 25, 50 e 75 °C; n = 3; q = espectrofotômetro	Carotenoides totais = 6,1 – 243, 0 mg/Kg	32
<i>Lycium barbarum</i> L.	Desenvolver um método de cromatografia preparativa para isolar componentes funcionais e estudar a sua atividade antioxidante.	Solvente e agitação. a = 10 g; s = 50 ml de solução de sulfato de sódio anidro 10%, 100 ml de hexano-etanol-acetona-tolueno (10: 6: 7: 7), seguida de 50 ml de hexano; t = 1 h; q = CLAE.	β – caroteno = 8,97 – 16,6 mg/g Neoxantina = 13,2 mg/g Fração de criptoxantina = 53,3 mg/g zeaxantina = 4,85 - 39,3 mg/g	33
Vegetais indianos	Determinar conteúdo de luteína em vegetais e óleos vegetais alimentares selecionados.	Solvente e maceração. a = 20 g frescos e moídos no liquidificador com sulfato de sódio (5 g) e 2 mM de α -tocoferol em etanol (0,1%); s = 50 mL de acetona; n = perda da cor; q = CLAE	Luteína = 65 – 10620 $\mu\text{g}/100\text{g}$ Zeaxantina – 2 – 62,85 $\mu\text{g}/100\text{g}$	34

(conclusão)

Tomate, milho branco e cenouras	Determinar as condições de extração máxima de carotenoides e testar a eficácia dos antioxidantes adicionados.	Solvente e agitação. a = 0,25-1,0 g vegetal liofilizado em pó; s = antioxidante e 10 ml de lactato de etila ou mistura lactato de etila / etanol (0-100%); t = 0 a 5h; T = 30, 45 e 60°C ; q = espectrofotômetro e CLAE	β -caroteno = 876,99 a 1140,54 $\mu\text{g/g}$; Luteína = 6,17 a 8,38 $\mu\text{g/g}$	9
Casca de tomate	Padronizar os parâmetros para a extração máxima de licopeno de pele desidratada de resíduos de tomate.	Solvente e agitação. a = casca de tomate seca; d = 0,05, 0,15, 0,25, 0,35 e 0,43 mm; s = (hexano: acetona: álcool 2: 1: 1) m:s = 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60 g/mL; t = 4, 8, 12, 16 e 20 min; T = 20, 30, 40, 50 e 60 °C; n = 1, 2, 3, 4 e 5; q = espectrofotômetro	Licopeno = 0,639 a 1,98 mg/100g	35

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Os artigos de quantificação, apesar de terem como objetivo principal avaliar o conteúdo de carotenoides na amostra podem ter diferentes focos, como o de caracterizar a matriz estudada, avaliando-a como fonte de carotenoides, ou a de melhorar a eficiência do método de extração e quantificação usado para uma amostra já conhecida.

Ao avaliar os efeitos da extração na determinação de luteína em espinafre (liofilizado e não liofilizado), Simonovska et al.²⁸ testaram diversos solventes (etanol, acetona, etanol-acetato de etila 1:1 (v/v), metanol - tetraidrofurano 1:1 (v/v)), obtendo rendimentos iguais de luteína (8,02 a 9,22 mg/100 g) em extrações de 15 minutos em temperatura ambiente. Os rendimentos foram melhorados com adição de 15% de acetato de trietilamônio 1M em todos os solventes, devido à neutralização dos ácidos e, provavelmente, pela capacidade de dissociar a luteína de complexos com proteínas e clorofilas.

Reif et al.²⁷ analisaram vegetais consumidos na Suíça, entres eles o espinafre, que apresentou conteúdo de luteína similar ao trabalho citado anteriormente (6,41 – 8,32 mg/100 g), com a intenção de compor banco de dados de carotenoides para vegetais suíços claramente identificados, cultivados em condições conhecidas e analisadas através de um protocolo padronizado. Foi encontrada uma forte correlação entre carotenoides e clorofila, indicando que os vegetais com coloração verde escura podem ser considerados como melhores fontes de carotenoides.

Os artigos de obtenção de carotenoides buscam, em sua maioria, otimizar as condições do método, de forma a gastar menor tempo e solvente e atingir maiores taxas de obtenção. Periago et al.³⁶ realizaram um estudo experimental para confirmar a hipótese de que as taxas de extração do licopeno a partir de tomate cru, molho e extrato de tomate são uma função do solvente utilizado (hexano, acetona e etanol) durante o processo de extração: realizada por 30 min. com 50 mL de solvente (mistura hexano, acetona e etanol, com proporção variando de 0 a 1). Embora o hexano tenha sido o principal solvente utilizado na extração, houve uma interação sinérgica positiva secundária deste com etanol (todos os tipos de amostras) e com acetona (amostras de polpa de tomate), o que sugere que a mistura que contém os três componentes foi essencial para a otimização do processo de extração. O teor de licopeno variou de 0,65-4,72 mg/100 g no tomate cru (47,8 de hexano, 15,1 de acetona, e 37,1 de etanol), 1,06-14,71 mg/100 g de molho no tomate (59,1% de hexano, 6,1% de acetona, e 34,8% de etanol), e 11,47-53,90 mg/100 g na polpa de tomate (58,7% de hexano, 18,1% de acetona, e 23,1% de etanol).

A eficiência de diversos solventes orgânicos para extrair carotenoides de descarte de tomate seco, além do efeito da temperatura, tempo e número de extrações foi avaliada por Strati e Oreopolou³². Três passos de extração, de 30 minutos cada um, foram suficientes para todos os solventes (lactato de etila, acetona, acetato de etila, hexano e etanol – 20 g de amostra em 200 mL), enquanto que o aumento da temperatura (de 25 para 70 °C) geralmente resultou num aumento de rendimento dos carotenoides, sendo o máximo de 243,00 mg/Kg em lactato de etila. Esse aumento na temperatura não foi relacionado à formação de isômeros. Também neste trabalho, os autores concluíram que o lactato de etila, solvente GRAS, é bastante promissor para uso na extração de carotenoides.

Em trabalho posterior, os autores examinaram misturas de solventes (hexano e acetato de etila), sua proporção para a amostra (pele e sementes de tomate), e o tamanho de partícula para otimizar as condições de extração. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada, de forma a permitir a avaliação do efeito de múltiplas variáveis e as suas interações. As condições otimizadas para a máxima produção de carotenoides (37,5 mg/kg de resíduo seco) foram de 45% de hexano, a mistura de solvente para a amostra na proporção de 1:9,1 (g/mL) e tamanho de partícula de 0,56 milímetros.²³

O uso de vegetais impróprios para consumo, como no caso dos resíduos de processamento industrial, foi citado em quatro dos estudos apresentados.^{22,24,32,35} Todos eles foram de descarte de tomate, com intuito de otimizar a obtenção de licopeno a partir de um subproduto, promovendo-o para uso como fonte de carotenoides bioativos para a indústria de alimentos e farmacêutica.

Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom (*Ultrasound assisted extraction* - UAE) consiste no uso da força de cavitação do ultrassom para perturbar as paredes celulares de plantas, gerando o rompimento do tecido superficial e facilitando a liberação dos compostos que estão sendo extraídos.³⁷ Esse rompimento do tecido gera aumento da transferência de massa na superfície, da difusão intrapartícula e do carregamento da câmara de extração com o substrato, resultando em aumento da taxa de extração e do rendimento dos compostos extraído, em especial no início do ciclo, e permitindo grande redução do tempo associado ao aumento do rendimento.³⁷⁻³⁹

Entretanto, esses resultados são dependentes, como em qualquer metodologia de extração, da natureza do composto e do tecido a ser extraído, da localização dos compostos na estrutura deste, e do tratamento da matriz anterior à extração.³⁸

Além do interesse relacionado ao rendimento, a UAE apresenta vantagens por ser um método de complemento, em que a metodologia de extração utilizada, geralmente com solventes, é melhorada sem a necessidade de grandes alterações. Com o aumento do rendimento e redução do tempo, há a redução no gasto de solventes, tornando a UAE uma alternativa econômica para processos de extração tradicional, que beneficia a demanda industrial por um desenvolvimento sustentável.³⁸

Na Tabela 2 estão apresentados alguns estudos que utilizaram UAE para obtenção de carotenoides em diferentes alimentos. Por ser um método alternativo, três deles^{37,40,41} utilizaram metodologia de superfície de resposta (RSM) para definir as melhores condições de obtenção de carotenoides com o uso do ultrassom, enquanto o último, apesar de não utilizar RSM, estudou o efeito de diferentes temperaturas, frequências e potências de ultrassom. Todos os trabalhos compararam a UAE com o método de extração convencional.

Tabela 2. Estudos de extração de carotenoides por extração assistida por ultrassom em fontes vegetais

Matriz	Objetivo	Método de extração/quantificação: amostra (a); diâmetro (d); relação massa:solvente (m:s); solvente (s); tempo (t); temperatura (T); amplitude (amp); frequência (f); potência (p); pressão (P); quantificação (q)	Conteúdo do extrato de carotenoides	Referência
Resíduos do processamento de tomate	Investigar a influência da aplicação de pressão moderada sobre a UAE de carotenoides a partir de polpa de tomate seco.	UAE: a = 3 g tomate seco moído; d = 4 mm; s = 100 mL de hexano:etanol (25:75, 50:50 e 75:25 %); t = 0 a 10 min; T = 25, 35 e 45°C; amp = 58, 76 e 94 µm; f = 20 kHz; P = 0, 50 e 100 kPa; q = HPLC	Carotenoides totais = 7,29 – 14,08 mg/100g	37
Cenoura	Desenvolver uma técnica de UAE inovadora, rápida e verde para carotenoides utilizando óleo de girassol como um solvente alternativo.	UAE: a = 100 a 300 g de cenoura seca moída; d = 0,25 mm; m:s = 1:10, 2:10 e 3:10; s = óleo de girassol; t = 5, 20 e 35 min; T = 20, 40 e 60 °C; p = 9,5 16 e 22,5 W/cm ⁻¹ ; q = UPLC	β-caroteno = 120,78 – 334,75 mg/L	40
Tomate	Otimizar as condições avaliadas na UAE, a fim de obter um maior rendimento de licopeno e minimizar sua degradação e isomerização durante o processo de extração.	UAE: a = 0,5 g tomate liofilizado; m:s = 53,2 a 86,8 mL/g; s = n-hexano, acetona e etanol (2:1:1); t = 23,2 a 56,8 min; T = 31,6 a 48,4 °C; f = 37 kHz; p = 340 W; q = HPLC e espectrofotômetro	all- <i>trans</i> -licopeno = 5,11 ± 0,27 mg / g	41
Farinha de milho	Investigar a forma como a extração de carotenoides de milho foi afetada por tratamento com ultrassons e qual a aplicabilidade.	UAE: a = 60 g tomate farinha de milho; m:s = 1:6 g/mL; s = etanol; t = 60 min; T = 30 e 40 °C; f = 20 e 25 kHz; p = 700, 800 e 900 W; q = espectrofotômetro	Carotenoides totais = 0,0519 – 0,0968 g /mL	39

UAE: Extração assistida por ultrassom (*Ultrasound assisted extraction*); CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Ao extrair carotenoides de farinha de milho, Ye et al.³⁹ concluíram que o ultrassom pode melhorar significativamente a extração de carotenoides, como um resultado do efeito da corrente turbulenta, efeito de perturbação e ação cumulativa. Em 12 minutos de extração a concentração de carotenoides com o uso de ultrassom foi 3,6 vezes maior que a extração sem o uso do mesmo. O aumento da potência de 700 W para 900 W teve efeito positivo no conteúdo de carotenoides, entretanto, causou aumento da temperatura, o que não é recomendado pela natureza termolábil dos carotenoides.

No estudo de Eh e Teoh⁴¹ a comparação entre extração de licopeno a partir de tomate por UAE e método convencional demonstrou que esse exerce melhoria na eficiência do rendimento de 26%, além de menor degradação e isomerização do licopeno.

Com o intuito de desenvolver uma técnica de extração inovadora, rápida e “verde”, Li et al.⁴⁰ utilizaram óleo de girassol como solvente alternativo para extração de carotenoides em cenouras frescas assistida por ultrassom. Como resultado, a concentração de β -caroteno obtida em 60 minutos de extração convencional com hexano (321,36 mg/L) foi obtida em 20 minutos de UAE com óleo de girassol (334,75 mg/L). A influência do uso de pressão moderada sobre a extração ultrassom assistida de carotenoides a partir de polpa de tomate seca, obtida através de resíduos do processamento, foi estudada por Luengo et al..³⁷ O rendimento dos carotenoides aumentou em 143% quando a pressão foi aumentada, possibilitando a diminuição do solvente e não ocorrendo degradação dos carotenoides.

Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas (*Microwave assisted extraction* - MAE) vem sendo amplamente estudada e utilizada em diversas áreas, como em produtos naturais e análise agrícola. Consiste na utilização de micro-ondas durante a extração, que gera calor e consequente pressão no interior da célula da matriz. Este aumento da pressão modifica o tecido, aumentando também a porosidade deste e, conseqüentemente, facilitando a entrada do solvente e a libertação do composto que se deseja extrair da matriz.^{15,42}

Dentre as vantagens, estão o menor gasto de solvente, menor tempo de extração e rendimento equivalente ou superior ao obtido na extração convencional sendo, por isso, proposta como método alternativo a esta.⁴³

Entretanto, se as condições operacionais aplicadas na MAE durante a extração (temperatura, tempo de tratamento e potência de micro-ondas) não forem adequadas, haverá instabilidade significativa dos compostos, e conseqüente degradação dos carotenoides, já que são compostos termolábeis.⁴³ Por isso, a baixa temperatura é especialmente importante para evitar a degradação dos componentes, demonstrando um bom potencial para a extração do composto lábil em alimentos, produtos farmacêuticos e produtos naturais por MAE.⁴⁴

Na Tabela 3 estão apresentados alguns estudos sobre a aplicação da MAE para obtenção de carotenoides em vegetais. Há uma busca evidente por aperfeiçoar o uso da MAE na extração de carotenoides em matrizes vegetais, estudando os fatores que apresentam influência na extração, como temperatura, poder de micro-ondas, tempo de extração, entre outros.

Tabela 3. Estudos de extração de carotenoides por extração assistida por micro-ondas em fontes vegetais

Matriz	Objetivo	Método de extração/quantificação: amostra (a); diâmetro (d); relação massa:solvente (m:s); solvente (s); tempo (t); temperatura (T); potência (p); energia (e); quantificação (q)	Conteúdo do extrato de carotenoides	Referência
Casca de tomate	Determinar as condições ótimas de MAE para o licopeno de cascas de tomate e avaliar o efeito do tratamento sobre os rendimentos <i>cis</i> e <i>trans</i> -licopeno.	MAE: a = 1, 2 ou 4 g de casca de tomate; m:s = 1:20, 2:20 e 4:20 g/mL; s = hexano:acetato de etila em 1:0, 1.5:0.5 e 1:1 mL/mL; p = 400, 800 e 1600 W; e = 24, 36 e 48 Kj; q = CLAE	Licopeno – 8,875 – 17,375 mg/100g	42
Casca de cenoura	Investigar uso viável de funcionamento intermitente de MAE a partir de casca de cenoura.	MAE intermitente: a = 2 g de casca de cenoura moída; s = 75 ou 150 mL (50% hexano, 25% acetona e 25% etanol); t = 3,5 a 19,5 min; p = 180 e 300 W; q = espectrofotômetro e CLAE.	Carotenoides totais = 219,01 – 276,44 mg/100g β – caroteno = 102,88 – 136,00 mg/100g	43
Cenoura	Investigar os efeitos dos métodos de pré-tratamento da amostra antes da extração por MAE.	MAE: a = 2 g de cenoura moída; d = 1,4 – 2 mm; s = 75mL (50% hexano, 25% acetona e 25% etanol) t = 1, 3 e 5 min; p = 100, 180 e 300 W; q = espectrofotômetro e CLAE.	Carotenoides totais = 51,79 – 61,62 mg/100 g β-caroteno = 23,26 – 32,08 mg/100 g	15
Cenoura	Desenvolver um método simples e eficiente efetuando a extração assistida por microondas em vácuo.	MAE. β-caroteno: a = 5,0 g; m:s = 1:8. 1:10 e 1:12 g/mL; s = 40 a 60 mL acetona: etanol (1: 2, v / v); t = 5, 10, 15 e 20 min com vácuo a 0,02 a 0,06 Mpa; T = 10, 15, 25 e 35 °C; p = 300, 500 e 700 W; q = CLAE.	β-caroteno = 9,86 mg/100g	44

MAE: Extração assistida por micro-ondas (*Microwave-assisted extraction*); CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Hiranvarachat et al.¹⁵ determinaram tempo e energia de micro-ondas adequados para extrair β -caroteno de cenouras utilizando MAE, além de avaliar o efeito de diferentes tratamentos antes da extração. O branqueamento em água e ácido cítrico aumentou de forma significativa o teor de β -caroteno no extrato, o que foi relacionado ao maior dano celular e melhor solubilização do pigmento. Foi realizada também uma comparação entre MAE e extração por Soxhlet, revelando que o extrato do MAE foi obtido com menor tempo de extração, entretanto, continha menor quantidade de β -caroteno e carotenoides totais e apresentava menor atividade antioxidante, o que sugeriu ser interessante o uso intermitente da MAE, de forma a aliar o menor tempo de obtenção à maiores teores de carotenoides e atividade antioxidante.

A partir destes resultados, um estudo utilizando a MAE intermitente foi realizado por Hiranvarachat e Devahastin⁴³, e a menor energia de micro-ondas, usada de forma intermitente, resultou em maiores teores de β -caroteno e carotenoides totais nos extratos, quando comparados com MAE contínuo nas mesmas condições correspondentes.

Ao comparar a UAE e a extração assistida por ultrassom e micro-ondas (UMAE), Lianfu e Zelong⁴⁵, concluíram que, com rendimentos de 89,4% e 97,4% para UAE e UMAE, respectivamente, este é muito mais eficiente. Ainda segundo os autores, a UAE é preferível à saponificação para quebrar a parede celular, por falta de envolvimento químico no processo, ao passo que a MAE aquece os extratos rapidamente e acelera o processo de extração pela adsorção e dessorção dos compostos de interesse a partir da matriz, apesar de ter como desvantagem o aquecimento não homogêneo, sendo o acoplamento das duas técnicas vantajoso.

Extração por líquido pressurizado

A extração por líquido pressurizado (*Pressurized liquid extraction* - PLE) ou extração por solvente acelerada (*Accelerated solvent extraction* - ASE) combina temperatura e pressão elevadas com o uso de solventes, permitindo a rápida extração dos componentes desejados. As altas temperaturas reduzem a viscosidade do solvente, aumentando a permeabilidade, e auxiliam nas quebras das ligações dos componentes com a matriz, incentivando a difusão e forçando o solvente em áreas que não seriam atingidas.⁴⁶⁻⁴⁸

Entretanto, temperaturas elevadas aumentam a solubilidade e transferência de massa, mas também diminuem a seletividade e podem afetar componentes termolábeis sujeitos

à degradação.⁴⁶⁻⁴⁸ A pressão reduz a tensão superficial do solvente, o que também facilita a penetração nos poros da matriz, resultando em rompimento da matriz e, portanto, aumento da transferência do componente da amostra para o solvente.^{47,48}

Na extração por água quente pressurizada (*Pressurized hot water extraction* – PHWE) a água é utilizada em vez de outro solvente orgânico. As mudanças nas propriedades físico-químicas da água, especialmente em sua constante dielétrica (ϵ), em temperaturas e pressões elevadas, aumentam a sua utilidade como um solvente de extração. A constante dielétrica diminui significativamente com temperatura e pressão elevadas, ficando mais próxima à constante de solventes como etanol e acetona, fazendo como que tenha ação parecida com a desses solventes, permitindo a extração de compostos de média ou baixa polaridade.^{46,47}

A aplicação da PLE era centrada na extração de poluentes ambientais e apenas recentemente vem sendo utilizada para extração de componentes de interesse em alimentos, como carotenoides. O interesse surgiu devido às vantagens desse tipo de extração, que tem o tempo de extração e volume de solvente significativamente reduzido, gerando economia de tempo e redução de custos.^{46,47}

Mustafa, Trevino e Turner⁴⁹, ao extraírem carotenoides de cenoura a partir de PLE, concluíram que o tempo e a temperatura de extração têm efeito significativo no rendimento, mas que aumentar a quantidade de solvente não melhora a extração, resultado que corrobora com o uso desta técnica para extrações mais eficientes e menor custo/gasto de solventes.

Em estudo recente, Saha et al.⁵⁰ aplicaram ASE para extração de carotenoides em cenoura e otimizaram os parâmetros utilizados, levando em consideração na escolha dos solventes parâmetros de solubilidade e constante dielétrica dos mesmos. O tempo e a temperatura apresentaram efeito significativo no rendimento, sendo obtido máximo de carotenoides com 60°C por 15 min. e três ciclos de extração a 1500 psi. Maiores volumes de solvente, assim como no estudo anterior, e maior número de extrações não obtiveram efeito positivo. Os parâmetros de solubilidade e constante dielétrica dos solventes foram de grande importância no processo de extração, sendo a mistura de acetona, hexano e etanol (1:3:2) a melhor.

Extração com fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico (*Supercritical fluid extraction* - SFE) é um método de extração que utiliza fluidos/solventes aquecidos acima de sua temperatura crítica. É uma alternativa ambientalmente segura para extração de carotenoides, sendo o fluido supercrítico mais utilizado o dióxido de carbono (CO₂), por não ser tóxico ou inflamável e estar disponível a baixo custo e alta pureza. O CO₂ também pode ser utilizado para extrair composto termolábeis, devido à sua temperatura crítica moderada. A partir destas características, o CO₂ é um solvente ideal para uso em alimentos, corantes, produtos farmacêuticos, entre outros.⁵¹

Apesar dos elevados custos de investimento associados à SFE serem apontados como fator limitante à sua propagação, o consumo de energia para a separação do solvente em LPSE faz o seu custo muito maior do que SFE, de modo que quando todos os custos são calculados, a SFE torna-se extremamente competitiva com os demais métodos de extração.¹⁶

Na Tabela 4 estão listados diferentes estudos que utilizaram SFE, todos tendo como objetivo a obtenção de carotenoides de matriz vegetal, aprimorando as condições de extração, como pressão, temperatura, e o uso de co-solventes.

Tabela 4. Estudos de extração de carotenoides por extração por fluido supercrítico em fontes vegetais

(continua)

Matriz	Objetivo	Método de extração/quantificação: amostra (a); diâmetro (d); relação massa:solvente (m:s); solvente (s); tempo (t); temperatura (T); fluxo (f); pressão (p); quantificação (q)	Conteúdo do extrato de carotenoides	Referência
Abóbora	Determinar mudanças de conteúdo e bioatividade dos extratos com modificadores.	SFE: a = 2 g amostra liofilizada; d = 1 mm; s = CO ₂ + (1) modificadores individuais (5%, 10% ou 15%): etanol, água, ou azeite de oliva; (2) modificadores misturados binários (5% ou 10%): etanol × água, água × azeite, ou de etanol x azeite; t = 1 h; T = 50 e 80 °C; f = 1,5 mL/min; p = 250 bar; q = CLAE.	Carotenoides totais = 0,930 – 6,198 mmol/kg α-caroteno = 0,086 – 2,638 mmol/kg β-caroteno = 0,2077 – 2,819 mmol/kg (9 + 13-cis)-β-caroteno = 0,204 – 0,933 mmol/kg Luteína e ésteres de luteína = 0,053 – 1,838 mmol/kg	13
Casca de oliva	Verificar como a pressão e temperatura influenciam rendimento de óleo e qualidade do extrato. Obter parâmetros cinéticos da extração e determinar efeito do co-solvente.	SFE: a = 25 g de casca de oliva seca; d = 0,33 mm; s = CO ₂ e etanol co-solvente; t = 0 a 6h; T = 313, 323 e 333 K; f = 1L/min; p = 25, 30 e 35 Mpa; q = espectrofotômetro.	Carotenoides totais = 8,01 – 16,44 ppm	14
Rosa Mosqueta	Analisar o efeito da temperatura, vazão e pressão de CO ₂ sobre o rendimento de extração de carotenóides em rosa mosqueta por SFE e relatar a cinética de extração.	SFE: a = 3,5 g de amostra seca; d = 0,665 mm; s = CO ₂ ; t = 150 min; T = 40 – 80°C; f = 2-4 ml/min; p = 150-450 bar; q = CLAE.	Carotenoides totais = 10,35 - 20,88 mg/g Licopeno = 1,180-14,37 mg/g β-caroteno = 0,154-1,017 mg/g Luteína = 1,25-16,84 mg/g	51

				(conclusão)
Pitanga	Estudar a extração de carotenoides por SFE em pitanga, com base na mudança na selectividade do dióxido de carbono como uma função das variáveis operacionais.	SFE: a = 5,6 g de polpa liofilizada; s = CO ₂ ; t = 120 min; T = 40 e 60 °C; f = 6,8 x 10 ⁵ Kg/s; p = 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 bar; q = CLAE.	Carotenoides totais = 5474 µ/g	10
Cenoura	Investigar uso potencial de óleo de canola como co-solvente na extração de carotenoides em cenoura por SFE.	SFE: a = 2g de amostra liofilizada extraída; d = 0,25-0,5, 0,5-1, e 1-2 mm; s = CO ₂ e óleo de canola como co-solvente 0, 2,5 e 5% (g/g); t = 4 h; T = 40, 55 e 70°C; f = 0,5, 1, e 2 L/min; p = 27,6, 41,3 e 55,1 Mpa; q = CLAE.	α-caroteno = 287,96 – 846,68 µg/g β-caroteno = 337,76 – 899,97 µg/g Luteína = 23,5 – 37,5 µg/g	52

SFE: Extração com fluido supercrítico (*Supercritical fluid extraction*); CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Filho et al.¹⁰ extraíram carotenoides de polpa de pitanga sob diferentes temperaturas e pressões por SFE com CO₂ supercrítico. Quando utilizadas pressões elevadas, o rendimento dos extratos foi maior com o aumento da temperatura, entretanto, em pressões mais baixas, as altas temperaturas causaram decréscimo no rendimento dos extratos. Desta forma, variar essas condições indicou que o CO₂ supercrítico extrai os carotenoides de forma seletiva, a depender das condições utilizadas, sendo a recuperação máxima de carotenoides obtida em 60°C e 250 bar, extraíndo 74% da rubixantina e 78% dos isômeros de licopeno.

Com intuito de determinar a melhor condição de extração de carotenoides a partir de frutos de rosa mosqueta por SFE com CO₂ supercrítico, Machmudah et al.⁵¹ realizaram um planejamento fatorial completo. Os resultados demonstraram que a temperatura foi a variável que exerceu maior influência sobre o rendimento de extração dos carotenoides totais. Para o licopeno, temperatura, pressão e taxa de fluxo de CO₂ tiveram influência, enquanto para β-caroteno e luteína a pressão e a taxa de fluxo foram determinantes.

Apesar da alta solubilidade dos carotenoides em CO₂, o alto peso molecular destes pigmentos é responsável por inibir essa solubilidade, devido à baixa volatilidade.⁵² Assim, é grande o número de estudos que utilizam os co-solventes, principalmente o etanol, como forma de aumentar a eficiência do processo de extração, tornando os carotenoides mais solúveis.⁵²

Buscando aumentar a eficiência da SFE por CO₂ Sun e Temelli (2006) investigaram o uso de óleo de canola como co-solvente no processo. O rendimento de α e β-caroteno aumentou duas vezes, enquanto o de luteína foi mais de quatro vezes maior que sem uso do óleo. Shi et al.¹³ estudaram o efeito de diferentes modificadores (etanol, água, azeite de oliva) e condições de processamento sobre o rendimento, composição e atividade antioxidante dos extratos de carotenoides por extração supercrítica com CO₂. Os modificadores e a temperatura claramente influenciaram a seletividade dos carotenoides, principalmente a proporção de *cis*-β-caroteno/carotenoides totais, sendo que todos os modificadores aumentaram o rendimento, menos a água (azeite > etanol > água).

CONCLUSÃO

Os trabalhos encontrados sobre extração de carotenoides estão divididos entre os de quantificação e os de obtenção. A maioria dos artigos encontrados ainda é de extração convencional, embora os artigos sobre SFE, MAE e UAE sugiram como uma tendência na busca pelo aperfeiçoamento das condições de extração, independente do propósito e do

método utilizado, ao mesmo tempo em que maiores teores de carotenoides são obtidos e/ou quantificados com menor custo operacional.

Desta forma, fica evidente que nenhum dos métodos apresentados pode ser considerado universal, devendo ser avaliadas as alternativas para escolha do mais adequado, inclusive a possibilidade de combinações, ponderando vantagens e desvantagens, de acordo com o propósito da extração e matriz vegetal a ser extraída.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento do projeto “Tecnologias de aproveitamento de descartes vegetais: integrando saúde, sustentabilidade e desenvolvimento social, junto a comunidades vulneráveis de Salvador-BA” – PET0015/2013 e Auxílio Dissertação – APR0218/2014 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Fraser, P. D.; Bramley, P. M.; *Prog. Lipid Res* **2004**, *43*, 228.
2. Khoo, H-E.; Prasad, K. N.; Kong, K-W.; Jiang, Y.; Ismail, A.; *Molecules* **2011**, *16*, 1710.
3. Krinsky, N. I.; *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1003.
4. Stahl, W.; Sies, H.; *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 345.
5. Rodriguez-Amaya, D. B.; Kimura, M.; Amaya-Farfan, J.; Em Fontes *brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos*; Coradin, L.; Pombo, V. B., eds.; Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas: Brasília, 2008.
6. Fiedor, J.; Burda, K; *Nutrients* **2014**, *6*, 466.
7. Freedman, N. D.; Park, Y.; Subar, A. F.; Hollenbeck, A. R.; Leitzmann, M. F.; Schatzkin, A.; Abnet, C.C.; *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 2330.
8. Austin, J.; Singhal, N.; Voigt, R.; Smaill, F.; Gill, M. J.; Walmsley, S.; Salit, I.; Gilmour, J.; Schlech, W. F.; Choudhri, S.; Rachlis, A.; Cohen, J.; Trottier, S.; Toma, E.; Phillips, P.; Ford, P. M.; Woods, R.; Singer, J.; Zarowny, D. P.; Cameron, D. W.; *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, *60*, 1266.
9. Ishida, B. K.; Chapman, M. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *11*, 1051.

10. Filho, G. L.; De Rosso, V. V.; Meireles, M. A. A.; Rosa, P. T. V.; Oliveira, A. L.; Mercadante, A. Z.; Cabral, F. A.; *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *46*, 33.
11. [http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-\\$1.4-billion-2018](http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-$1.4-billion-2018), acessada em Março 2014.
12. Strati, I. F.; Oreopoulou, V.; *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 311.
13. Shi, X.; Wu, H.; Shi, J.; Xue, S. J.; Wang, D.; Wang, W.; Cheng, A.; Gong, Z.; Chen, X.; Wang, C.; *LWT--Food Sci. Technol.* **2013**, *51*, 433.
14. Gracia, I.; Rodriguez, J. F.; Lucas, A.; Fernandez-Ronco, M. P.; *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *59*, 72.
15. Hiranvarachat. B.; Devahastin, S.; Chiewchan, N.; Vijaya Raghavan, G. S.; *J. Food Eng.* **2013**, *115*, 190.
16. Prado, J. M.; Veggi, P. C.; Meireles, A. A. *Curr. Anal. Chem.* **2014**, *10*, 29.
17. Rodriguez-Amaya, D. B.; Kimura, M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*; Washington, DC: International Food Policy Research Institute; Cali: International Center for Tropical Agriculture, 2004.
18. Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23*, 726.
19. Amorim-Carrilho, K. T.; Cepeda, A.; Fente, C.; Regal, P.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2014**, *56*, 49.
20. Riggi, E.; *Recent Pat. Food, Nutr. Agric.* **2010**, *2*, 75.
21. Mustafa, A.; Turner, C.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 8.
22. Khoo, H-E.; Prasad, K. N.; Kong, K-W.; Jiang, Y.; Ismail, A.; *Molecules* **2011**, *16*, 1710.
23. Strati, I. F.; Oureoupolu, V. *Food Chem.* **2011**, *129*, 747.
24. Stajčić, S.; Četković, G.; Čanadanović-Brunet, J.; Djilas, S.; Mandić, A.; Četojević-Simin, D.; *Food Chem.* **2015**, *172*, 225.
25. Kao, F-J.; Chiu, Y-S.; Chiang, W-D.; *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 202.
26. Reif, C.; Arrigoni, E.; Berger, F.; Baumgartner, D.; Nyström, L.; *LWT--Food Sci. Technol.* **2013**, *53*, 378.
27. Reif, C.; Arrigoni, E.; Schärer, H.; Nyström, L.; Hurrell, R. F.; *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *29*, 64.
28. Simonovska, B.; Vovk, I.; Glavnik, V.; Cernelic, K.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1276*, 95.
29. Guzman, I.; Yousef, G. G.; Brown, A. F.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7238.

30. Garzón, G. A.; Narváez-Cuenca, C-E.; Kopec, R. E.; Barry, A. M.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4709.
31. Hernandez-Ortega, M.; Ortiz-Moreno, A.; Hernández-Navarro, M. D.; Chamorro-Cevallos, G.; Dorantes-Alvarez, L.; Necochea-Mondragón, H.; *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*.
32. Strati, I. F.; Oreoupoulou, V.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 23.
33. Wang, C. C.; Chang, S. C.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H.; *Food Chem.* **2010**, *120*, 184.
34. Aruna, G.; Mamatha, B. S.; Baskaran, V.; *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 632.
35. Kaur, D.; Wani, A. A.; Oberoi, D. P. S.; Sogi, D. S.; *Food Chem.* **2008**, *108*, 711.
36. Periago, M. J.; RINCÓN, F.; AGÜERA, M. D.; ROS, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5796.
37. Luengo, E.; Condón-Abanto, S.; Condón, S.; Álvarez, I.; Raso, J.; *Sep. Purif. Technol.* **2014** *136*, 130.
38. Vilku, K.; Mawson, R.; 2008; Simons, L.; Bates, D.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2008**, *9*, 161.
39. Ye, J.; Feng, L.; Xiong, J.; Xiong, Y.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2131.
40. Li, Y.; Fabiano-Tixier, A. S.; Tomao, V.; Cravotto, G.; Chemat, F.; *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 12.
41. Eh, A. L-S.; Teoh, S-G.; *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19*, 151.
42. Ho, K. K. H. Y.; Ferruzzi, M. G.; Liceaga, A. M.; San Martín-Gonzalez, M. F.; *LWT-- Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 160.
43. Hiranvarachat, B.; Devahastin, S.; *J. Food Eng.* **2014**, *126*, 17.
44. Xiao, X.; Song, W.; Wang, J.; Li, G.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *712*, 85.
45. Lianfu, Z.; Zelong, L.; *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15*, 731.
46. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, L.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1089*, 1.
47. Mustafa, A.; Turner, C.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 8.
48. Sun, H.; Ge, X.; Lv, Y.; Wang, A.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1237*, 1.
49. Mustafa, A.; Trevino, L. M.; Turner, C. *Molecules* **2012**, *17*, 1809

50. Saha, S.; Walia, S.; Kundu, A.; Sharma, K.; Paul, R. K.; *Food Chem.* **2015**, *177*, 389.

51. Machmudah, S.; Kawahito, Y.; Sasaki, M.; Goto, M.; *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *44*, 308.

52. Sun, M.; Temelli, F.; *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *37*, 397

CAPÍTULO III

ARTIGO II: OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES A PARTIR DA FOLHA EXTERNA DO DESCARTE DE REPOLHO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver método para a obtenção de carotenoides, a partir da folha externa do repolho, através de planejamento composto central, comparando-o ao método de extração convencional com vistas à aplicação como corante, antioxidante natural, e/ou na fortificação de alimentos. O teor de carotenoides obtido pelo método convencional foi de $416,67 \pm 6,60 \mu\text{g/g}$, e de $393,30 \pm 3,73 \mu\text{g/g}$ para a melhor condição do planejamento (amostra esterilizada, relação massa:volume 0,5:10 g/mL e 2 extrações com etanol de 120 min/30°C com saponificação simultânea), representando 94,39% do obtido no convencional, com menor tempo e volume de solvente. O *all-trans*- β -caroteno foi o pigmento principal dos extratos, seguido de luteína. A porcentagem de inibição do DPPH foi de $32,06 \pm 1,63$ e $30,88 \pm 0,22 \%$ e do ABTS de $25,47 \pm 0,60$ e $20,11 \pm 0,04 \%$, para extração convencional e condição ótima do planejamento, respectivamente. Entretanto, os mesmos não aumentaram a estabilidade oxidativa do óleo de palma refinado submetido ao Rancimat. A folha externa de repolho apresentou-se como uma potencial fonte para obtenção de extrato rico em *all-trans*- β -caroteno e luteína, produtos de alto valor agregado com possibilidade de aplicação na indústria de alimentos para fortificação e/ou como corantes e antioxidantes naturais, nesse caso, em ausência de oxigênio e de temperaturas elevadas.

PALAVRAS CHAVE: β -caroteno; extração; atividade antioxidante; DPPH; ABTS; superfície de resposta.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são uma classe de mais de 600 pigmentos naturais sintetizados por plantas, algas, fungos e bactérias, de cores que variam do amarelo ao vermelho, sendo o α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, licopeno e zeaxantina os carotenoides dietéticos mais comuns (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; SKIBSTED, 2012; KHOO et al., 2011).

Estes pigmentos têm diversas funções benéficas ao ser humano, como precursores da vitamina A, como antioxidantes, participando da regulação do crescimento celular, modulação da expressão de genes e resposta imunológica, com consequente redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada à idade (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; FRASER e BRAMLEY, 2004; FIEDOR e BURDA, 2014).

Por causa dessas propriedades biológicas, os carotenoides atraíram grande atenção da indústria de alimentos, sendo usados como suplementos dietéticos, em alimentos enriquecidos, corantes alimentícios, ração animal, produtos farmacêuticos e cosméticos (SHI et al., 2013; WANG et al., 2007; VALDUGA et al., 2009; STRATI e OREOPOULOU, 2014). Assim, com a demanda de produtos naturais, é crescente o número de estudos sobre a obtenção de carotenoides, que podem ser extraídos de vegetais, algas e fungos.

Devido à variedade de fontes e diversidade de carotenoides, não existe método único estabelecido para a extração deste pigmento (PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014). Do ponto de vista industrial, a extração com solventes é a primeira opção, por ser simples e de baixo custo, apesar das desvantagens relacionadas ao uso de altas temperaturas e de solventes orgânicos, que podem ser minimizadas com a definição das condições ótimas de obtenção e uso de solventes seguros (Generally Recognized as Safe - GRAS) (RIGGI, 2010; PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014). Por isso, é necessário levar em consideração na extração de carotenoides a fonte vegetal, o solvente utilizado, o processamento do material sólido, as técnicas de extração utilizadas, além da influência da temperatura e tempo sobre o rendimento (PRADO, VEGGI e MEIRELES, 2014). Apesar disso, são poucos os trabalhos encontrados na literatura com objetivo de definir condições ótimas das condições de extração (STRATI e OREOPOULOU, 2011a).

Vários estudos, com objetivo de obtenção de carotenoides, utilizam descarte de vegetais sem valor comercial e/ou resíduos do processamento de vegetais, pois os mesmos contêm muitas substâncias reutilizáveis, que dependerão de uma tecnologia adequada para converter essa matéria residual em produtos comerciais com alto valor agregado (STRATI E

OUREOUPOLU, 2011a; HIRANVARACHAT et al., 2013; SHI et al., 2013). O valor do mercado mundial de carotenoides utilizados comercialmente foi cerca de US \$ 1,2 bilhão em 2010, com uma chance de crescer para US \$ 1,4 bilhões em 2018, com uma taxa de crescimento anual composta de 2,3% (MÄRZ, 2011). Esses dados apontam para a necessidade de mais estudos relacionados à obtenção de desses pigmentos.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver método para a obtenção de carotenoides a partir da folha externa do repolho, descartada e sem valor comercial, com vistas à aplicação como corante, antioxidante natural, e/ou na fortificação de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

As folhas externas de repolho foram coletadas dentre os alimentos sem valor comercial doados por uma rede atacadista local e imediatamente levadas para o Laboratório de Bioquímica dos Alimentos, da Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia.

Os folhosos foram lavados em água corrente, permitindo a retirada de contaminantes físicos, drenados e divididos em duas partes: uma que foi imediatamente congelada em freezer a -80°C e outra que foi esterilizada em autoclave universal (AV-110 Phoenix, Araraquara, São Paulo) ($121^{\circ}\text{C}/15$ minutos) e posteriormente congelada nas mesmas condições que a anterior (NUNES E MERCADANTE, 2004).

As amostras congeladas foram levadas ao liofilizador (Terroni LS 3000, Terroni, São Carlos, São Paulo, Brasil) por 24h para secagem. Após esse período, as mesmas foram trituradas em processador de aço inox, armazenadas em frascos âmbar, fechadas em atmosfera inerte (nitrogênio), e mantidas em refrigeração até o momento das análises.

2.2. EXTRAÇÃO/OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CAROTENOIDES

2.2.1. Extração convencional

Os carotenoides foram extraídos da amostra liofilizada e autoclavada (0,5 g) com acetona, sob condições de iluminação reduzida, até a perda da cor e saponificados com solução 10% de KOH em metanol à temperatura ambiente por uma noite, seguido de lavagem com água para retirada do álcali (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Após a remoção do álcali, o extrato foi transferido para éter de petróleo e a quantificação dos carotenoides totais realizada em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) através de leitura da absorbância no comprimento de onda máximo de absorção do β -caroteno em éter de petróleo (450 nm), e a

concentração calculada considerando o coeficiente de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2592 (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A extração foi realizada em três repetições.

2.2.2. Planejamento Fatorial Fracionário $2^{(5-1)}$

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-1)}$, com intuito de definir as variáveis significativas na extração dos carotenoides a partir da folha externa do repolho. Os seguintes fatores e níveis foram estudados: temperatura (30 e 50°C), relação massa:volume (0,5:15 e 0,5:25 g/mL), número de extrações (3 e 5), tempo (30 e 60 minutos) e esterilização (sim ou não), totalizando 16 experimentos, cuja resposta foi expressa como conteúdo de carotenoides totais em $\mu\text{g/g}$. Todos os experimentos foram realizados em incubadora do tipo shaker (Modelo CT 712, Cientec, São Paulo, Brasil) utilizando álcool etílico como solvente e saponificação simultânea com KOH etanólico a 10%. Após a extração foi realizada a remoção do álcali, os extratos foram transferidos para éter de petróleo, e os carotenoides totais quantificados como descrito no item 2.2.1. Todos os experimentos foram realizados em três repetições.

2.2.3. Planejamento Composto Central 2^3

Um planejamento composto central 2^3 com pontos centrais e axiais foi realizado com as variáveis que apresentaram maior efeito sobre a obtenção de carotenoides no planejamento fracionário, buscando otimizar o método. Todos os experimentos foram realizados como no item 2.2.2. As respostas finais dos experimentos foram expressas como teor de carotenoides totais em $\mu\text{g/g}$, porcentagem de redução dos radicais DPPH e ABTS, tempo de indução do óleo de palma refinado adicionado dos extratos e cor (CIELAB).

2.3. ANÁLISE DOS CAROTENOIDES MAJORITÁRIOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os extratos de carotenoides obtidos através do ponto ótimo do planejamento composto central e da extração convencional foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento com degaseificador, bomba de solvente quaternária e detector UV/vis para a separação dos carotenoides. Para tal foi utilizada coluna C_{30} de fase reversa polimérica ($3\mu\text{m}$, $250 \times 4,6\text{mm}$) (YMC) e a fase móvel foi composta de água/metanol/éter tert metil butílico (MTBE) (J. T. Baker-Mallinckrodt), começando com proporções de 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 min, 0:89:11 em 25 min, 0:75:25 em 40 min e, por fim, 0:50:50 depois de 60 min, com um fluxo de 1 mL/min a 33 °C (ZANATTA e

MERCADANTE, 2007). Para a quantificação dos carotenoides majoritários, foram construídas curvas padrões de *all-trans*- β -caroteno (5-50 $\mu\text{g/mL}$), *all-trans*- α -caroteno (2-25 $\mu\text{g/mL}$), luteína (1-65 $\mu\text{g/mL}$), zeaxantina (1-40 $\mu\text{g/mL}$) e criptoxantina (4-100 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich). Os limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD) foram, respectivamente, para *all-trans*- β -caroteno $10,89 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$ e $6,53 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$; para criptoxantina, $3,51 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$ e $2,11 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$; para *all-trans*- α -caroteno, $3,28 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$ e $1,97 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$; para luteína, $1,15 \times 10^{-2} \text{ mg.kg}^{-1}$ e $6,9 \times 10^{-3} \text{ mg.kg}^{-1}$; e para zeaxantina, $1,59 \times 10^{-2} \text{ mg.kg}^{-1}$ e $9,56 \times 10^{-2} \text{ mg.kg}^{-1}$. As áreas dos picos foram comparadas com as curvas de calibração. Os resultados foram expressos em μg de carotenoides por g de amostra.

2.4. COR

A determinação da cor dos extratos (planejamento composto central e extração convencional) foi realizada em colorímetro Minolta CR-400 com iluminante D65, ângulo de observação de 2° utilizando-se a escala CIELab, sendo L^* a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* intensidade de vermelho, variando de verde a vermelho ($-a^*/+a^*$); b^* intensidade de amarelo, variando de azul a amarelo ($-b^*/+b^*$).

2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.5.1. Atividade Antioxidante Total através do Radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos determinada através do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (planejamento composto central e extração convencional) foi realizada segundo Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Os extratos (1mL) foram dissolvidos em 3 mL de solução de DPPH $1\mu\text{M}$ em metanol. A mistura foi agitada por 10 segundos e a leitura realizada após 30 minutos de reação em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) no comprimento de onda de 515 nm. O resultado final foi expresso como porcentagem de inibição do radical (Equação 1):

$$\text{Atividade (\%)} [(A_{\text{controle}} - A_{\text{teste}})/A_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: A_{controle} é a absorbância da solução de DPPH sem adição do extrato e A_{teste} é a absorbância da solução do DPPH adicionada do extrato.

2.5.2. Atividade Antioxidante Total através do radical ABTS

A atividade antioxidante dos extratos (planejamento composto central e extração convencional) por ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi realizada de acordo com Re et al. (1999), com modificações. O radical ABTS foi produzido a partir da reação da solução estoque de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) na relação 2:1 e repouso no escuro e temperatura ambiente durante 16 horas. Esta solução foi diluída em álcool etílico até absorvância de $0,70 \pm 0,05$ em 734 nm.

Os extratos (300 μ L) foram dissolvidos em 3 mL do radical ABTS e agitados por 10 s. A leitura foi realizada após seis minutos de reação em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Ayer Rajah Crescent, Singapore) no comprimento de onda de 734 nm. O resultado final foi expresso como porcentagem de inibição do radical (Equação 2):

$$\text{Atividade (\%)} [(A_{\text{controle}} - A_{\text{teste}})/A_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: A_{controle} é a absorvância do radical ABTS sem adição do extrato e A_{teste} é a absorvância do radical adicionada do extrato.

2.5.3. Aplicação dos extratos de carotenoides como antioxidantes em óleo de palma refinado

Para avaliação da ação antioxidante dos extratos obtidos (melhor condição do planejamento composto central e extração convencional) no tempo de indução de óleo de palma refinado (doador pela Cargill Agrícola SA, Brasil) submetido à oxidação acelerada em Rancimat (743, Methrom, AG, Herisau, Switzerland), os mesmos foram concentrados em evaporador rotatório, adicionados ao óleo de palma (3 g) nos tubos de vidro próprios do Rancimat, homogeneizados em vórtex por 10 segundos e submetidos a um fluxo de nitrogênio por aproximadamente 5 minutos para evaporação total do solvente. O óleo de palma refinado foi previamente submetido à quantificação de carotenoides em espectrofotômetro, que confirmou a ausência dos pigmentos. Como controles foram realizados experimentos com óleo de palma sem antioxidante e com adição de TBHQ (200 mg/Kg), que foi adicionado diretamente no óleo e agitado até completa homogeneização. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e nas mesmas condições de temperatura (120°C) e fluxo de ar (20 L/h).

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados utilizando o software Statistica 7.0 e análise de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar o efeito da cada termo, as interações e sua significância estatística ($p < 0,05$) no modelo. Os resultados de carotenoides totais, cor, DPPH radical, ABTS radical e de estabilidade em Rancimat foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis no IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22 para verificar diferenças entre as respostas de cada experimento, seguido do teste de Mann-Whitney, corrigido segundo o método de Bonferroni. Os carotenoides majoritários dos extratos foram comparados através do teste t de Student ($p < 0,05$), e a ANOVA foi realizada para analisar diferenças entre os resultados da estabilidade em Rancimat do óleo acrescido do extrato do ponto ótimo do planejamento, do método convencional e do antioxidante TBHQ ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

O valor médio de carotenoides totais, obtido pelo método de extração convencional, foi de 416,67 $\mu\text{g/g}$ de amostra. Não foram encontrados estudos sobre extração de carotenoides da folha externa de repolho. Kaulmann et al. (2014) encontraram para o repolho branco 50,5 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides totais, valor muito menor quando comparado ao encontrado na amostra desse estudo.

Reif et al. (2013), ao analisar diversos vegetais comumente consumidos na Suíça, encontraram uma forte correlação entre carotenoides e clorofila, indicando que os vegetais verde escuros podem ser considerados como melhores fontes de carotenoides. O teor de carotenoides encontrado em brócolis, por Guzman, Yousef e Brown (2012), através de extração convencional, foi de 222,8 a 367,6 $\mu\text{g/g}$, valores menores que os encontrados para a folha neste estudo, o que indica que esta seja uma boa fonte de carotenoides.

Os valores codificados e reais do planejamento fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾ podem ser verificados na Tabela 1. O etanol foi escolhido como solvente de extração, por ser um solvente GRAS (Generally Recognized as Safe) (21 CRF 184.1293, 2012). A concentração de carotenoides totais variou entre 189,58 a 343,78 $\mu\text{g/g}$, atingindo maior valor no ensaio 5, com 82,51% de carotenoides em relação ao obtido no método convencional (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições experimentais do planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾ e resposta para extração de carotenoides em folha externa de repolho.

Ensaio	Fatores					Resposta	
	Temperatura (C°)	Relação massa/volume (g/mL)	Número de extrações	Tempo de extração (minutos)	Esterilização	Carotenoides totais (µg/g)	% em relação EC ^a
1	30 (-1)	0,5:15 (-1)	3 (-1)	30 (-1)	Não (+1)	189,58 ± 1,97	45,50
2	50 (+1)	0,5:15 (-1)	3 (-1)	30 (-1)	Sim (-1)	290,16 ± 7,04	69,64
3	30 (-1)	0,5:25 (+1)	3 (-1)	30 (-1)	Sim (-1)	308,36 ± 1,19	74,00
4	50 (+1)	0,5:25 (+1)	3 (-1)	30 (-1)	Não (+1)	167,66 ± 2,88	40,24
5	30 (-1)	0,5:15 (-1)	5 (+1)	30 (-1)	Sim (-1)	343,78 ± 1,48	82,51
6	50 (+1)	0,5:15 (-1)	5 (+1)	30 (-1)	Não (+1)	181,65 ± 4,60	43,60
7	30 (-1)	0,5:25 (+1)	5 (+1)	30 (-1)	Não (+1)	294,04 ± 5,89	70,57
8	50 (+1)	0,5:25 (+1)	5 (+1)	30 (-1)	Sim (-1)	222,60 ± 7,06	53,42
9	30 (-1)	0,5:15 (-1)	3 (-1)	60 (+1)	Sim (-1)	296,69 ± 4,53	71,21
10	50 (+1)	0,5:15 (-1)	3 (-1)	60 (+1)	Não (+1)	339,86 ± 2,54	81,57
11	30 (-1)	0,5:25 (+1)	3 (-1)	60 (+1)	Não (+1)	312,65 ± 6,62	75,03
12	50 (+1)	0,5:25 (+1)	3 (-1)	60 (+1)	Sim (-1)	280,51 ± 7,47	67,32
13	30 (-1)	0,5:15 (-1)	5 (+1)	60 (+1)	Não (+1)	251,79 ± 3,41	60,43
14	50 (+1)	0,5:15 (-1)	5 (+1)	60 (+1)	Sim (-1)	288,56 ± 1,30	69,25
15	30 (-1)	0,5:25 (+1)	5 (+1)	60 (+1)	Sim (-1)	218,65 ± 1,26	52,48
16	50 (+1)	0,5:25 (+1)	5 (+1)	60 (+1)	Não (+1)	252,13 ± 3,17	60,51

R² = 0,9913. EC = Extração convencional. ^aPorcentagem de carotenoides totais obtidos em relação ao método de extração convencional (416,67 ± 6,60 µg/g).

Todos os fatores apresentaram efeitos significativos no conteúdo de carotenoides totais (Tabela 2). Como o objetivo do planejamento fracionário é detectar a importância dos efeitos e eliminar os fatores que sejam menos importantes, foram analisados os valores dos efeitos de cada fator.

Os fatores esterilização, tempo de extração e temperatura, foram os que tiveram maior efeito na resposta, respectivamente. A esterilização ocasionou aumento no teor de carotenoides totais, apesar do valor do efeito ter sido negativo, o que indica que há queda no rendimento quando a amostra não é esterilizada. Alguns estudos demonstram que o processo de esterilização facilita a quebra da parede celular, tornando a obtenção do pigmento mais fácil (NUNES E MERCADANTE, 2004; KAO, CHIU e CHIANG, 2014).

Tabela 2 – Efeitos dos fatores do planejamento fatorial fracionário 2⁽⁵⁻¹⁾

	Efeitos	p ^a
Temperatura (C°)	-24,0570	0,000000
Relação massa/volume (g/mL)	-15,6805	0,000000
Número de extrações	-16,5275	0,000000
Tempo de extração (minutos)	30,3693	0,000000
Esterilização	-32,4976	0,000000

^ap<0,05

O tempo de extração apresentou efeito positivo no teor de carotenoides, por prolongar o contato do solvente com a amostra, o que está em concordância com outros estudos (STRATI E OREOUPOLOU, 2011b; KAMFFER, BINDON e OBERHOLSTER, 2010). O efeito negativo da temperatura de extração no teor de carotenoides indica que temperaturas inferiores a 50°C, nível superior deste fator no experimento, seriam mais indicadas para o processo de extração. Ishida e Chapman (2009), ao extraírem β -caroteno e luteína de vegetais liofilizados a 30, 45 e 60°C, concluíram que estes são mais eficientemente extraídos a 30°C, por serem menos estáveis a temperaturas mais elevadas.

A relação massa:volume e o número de extrações também apresentaram efeitos negativos, apesar de menores que os demais. Kaur et al. (2008) fizeram a otimização da extração de licopeno em pele de tomate com diversos níveis para a relação massa:volume (1:20, 1:30, 1:40, 1:50, e 1:60 g/mL) e encontraram alterações significantes no rendimento do licopeno, concluindo-se que a melhor condição foi obtida com a relação 1:30 g/mL, ou seja, o resultado foi melhor quando a relação foi mantida em seu nível inferior, como neste estudo. Quanto ao número de extrações, o efeito negativo pode estar relacionado ao maior número de etapas utilizadas para a extração, resultando em perdas durante o processo.

A partir dos resultados do planejamento fracionário, um planejamento composto central 2^3 foi realizado para obter as melhores condições de extração, tornando o rendimento o mais próximo possível do obtido com a extração convencional. Para isso, as amostras foram esterilizadas e a temperatura foi definida em 30°, já que este fator apresentou efeito negativo no planejamento fracionário, sendo mantido em seu nível inferior. Os fatores e níveis codificados e reais estão na Tabela 3, assim como as respostas do planejamento.

Tabela 3 - Condições experimentais do planejamento composto central 2³ e respostas para extração de carotenoides, % de redução do DPPH, % de redução do ABTS, tempo de indução e cor (CIELAB).

Ensaio	Fatores			Respostas							
	Tempo de extração (minutos)	Razão massa:volume (g/mL)	Número de extrações	Carotenoides totais (µg/g)	% relação à EC ^a	% redução DPPH	% redução ABTS	Tempo de indução (horas)	L*	a*	b*
EC	-	-	-	416,67 ± 6,60	-	32,06 ± 1,63	25,47 ± 0,60	13,01 ± 0,14	60,72 ± 0,25	- 6,06 ± 0,05	22,33 ± 0,35
1	60 (-1,00)	0,5:10 (-1,00)	2 (-1,00)	314,66 ± 2,34	75,52	23,79 ± 0,31	18,41 ± 0,46	12,39 ± 0,42	62,01 ± 0,05	- 4,97 ± 0,15	17,96 ± 0,37
2	60 (-1,00)	0,5:10 (-1,00)	4 (+1,00)	316,16 ± 5,05	75,88	22,10 ± 0,03	18,14 ± 0,70	12,15 ± 0,57	62,35 ± 0,10	- 4,30 ± 0,22	15,67 ± 0,66
3	60 (-1,00)	0,5:20 (+1,00)	2 (-1,00)	313,03 ± 2,52	75,13	23,86 ± 0,10	18,49 ± 0,24	12,14 ± 0,78	62,28 ± 0,04	- 5,03 ± 0,05	22,08 ± 1,02
4	60 (-1,00)	0,5:20 (+1,00)	4 (+1,00)	314,32 ± 3,61	75,43	21,92 ± 0,72	17,80 ± 0,17	12,10 ± 0,72	62,44 ± 0,08	- 4,35 ± 0,24	15,54 ± 0,40
5	120 (+1,00)	0,5:10 (-1,00)	2 (-1,00)	393,30 ± 3,73	94,39	30,88 ± 0,22	20,11 ± 0,04	12,65 ± 0,13	62,49 ± 0,05	- 4,95 ± 0,13	19,59 ± 0,96
6	120 (+1,00)	0,5:10 (-1,00)	4 (+1,00)	394,93 ± 3,24	94,78	31,28 ± 0,30	20,04 ± 0,07	12,79 ± 0,17	61,33 ± 0,08	- 4,98 ± 0,11	18,97 ± 0,05
7	120 (+1,00)	0,5:20 (+1,00)	2 (-1,00)	414,42 ± 9,75	99,46	32,27 ± 0,64	25,46 ± 0,32	13,32 ± 0,59	61,14 ± 0,22	- 6,09 ± 0,03	22,31 ± 0,30
8	120 (+1,00)	0,5:20 (+1,00)	4 (+1,00)	416,29 ± 5,41	99,91	32,82 ± 0,90	26,22 ± 0,13	13,85 ± 0,27	60,92 ± 0,87	- 6,12 ± 0,03	22,93 ± 0,15
9	40 (-1,68)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	396,07 ± 8,66	95,06	31,28 ± 0,70	20,30 ± 0,23	12,50 ± 0,44	61,68 ± 0,22	- 4,98 ± 0,05	19,04 ± 0,11
10	140 (1,68)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	406,34 ± 3,01	97,52	32,22 ± 0,51	24,05 ± 0,14	12,32 ± 0,42	62,71 ± 0,56	- 5,11 ± 0,02	19,05 ± 0,02
11	90 (0,00)	0,5:7 (-1,68)	3 (0,00)	409,08 ± 2,64	98,18	33,05 ± 0,28	25,11 ± 0,44	12,09 ± 0,25	61,97 ± 0,03	- 6,03 ± 0,28	22,08 ± 1,03
12	90 (0,00)	0,5:24 (1,68)	3 (0,00)	347,11 ± 8,01	83,30	26,22 ± 0,46	19,85 ± 0,15	12,18 ± 0,31	62,10 ± 0,09	- 5,11 ± 0,01	18,57 ± 0,25
13	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	1 (-1,68)	295,41 ± 0,47	70,90	18,97 ± 0,32	13,53 ± 0,76	11,89 ± 0,19	62,60 ± 0,14	- 4,37 ± 0,06	14,78 ± 0,21
14	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	5 (1,68)	308,69 ± 2,65	74,08	19,84 ± 0,28	15,73 ± 0,53	12,39 ± 0,37	62,48 ± 0,02	- 4,16 ± 0,07	15,13 ± 0,18
15 C	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	344,65 ± 3,90	82,72	26,28 ± 0,54	18,92 ± 0,41	12,38 ± 0,37	62,38 ± 0,04	- 5,00 ± 0,03	18,27 ± 0,54
16 C	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	346,56 ± 5,87	83,17	26,53 ± 0,56	18,73 ± 0,31	12,22 ± 0,67	62,44 ± 0,12	- 4,96 ± 0,03	17,67 ± 1,25
17 C	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	339,77 ± 6,34	81,54	24,41 ± 0,46	18,37 ± 0,19	12,08 ± 0,83	62,48 ± 0,06	- 4,88 ± 0,15	17,35 ± 0,51
18 C	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	351,98 ± 3,48	84,47	26,16 ± 0,10	18,51 ± 0,31	12,19 ± 0,09	61,83 ± 0,07	- 5,14 ± 0,16	18,44 ± 0,52
19 C	90 (0,00)	0,5:15 (0,00)	3 (0,00)	344,27 ± 4,47	82,62	26,18 ± 0,36	18,91 ± 0,62	12,26 ± 0,35	61,89 ± 0,04	- 5,11 ± 0,02	18,32 ± 0,16

EC = Extração convencional; ^a Porcentagem de carotenoides totais obtidos em relação ao método de extração convencional.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar a significância estatística dos efeitos principais e interações. As equações dos modelos, com termos lineares, quadráticos e de interação, que apresentaram maior ajuste e efeito nas respostas, estão na Tabela 4. O valor do R^2 para a resposta carotenoides totais foi de 0,7366, indicando que 73,5% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. A variabilidade não explicada pelo modelo pode estar relacionada a outros fatores que influenciaram na resposta e não foram estudados por esse modelo.

Tabela 4 – Equações do modelo e R^2 (coeficiente de determinação) para as respostas carotenoides totais, % de redução do DPPH e % de redução do ABTS.

	Equações dos Modelos	R^2
Carotenoides totais	$Y = 456,3741 - 3,5299 X_1 - 17,8159 X_2 + 96,0667 X_3 + 0,0215 X_1^2 + 0,4471 X_2^2 - 15,7087 X_3^2 + 0,0381 X_1 X_2.$	0,7366
% redução do DPPH	$Y = 40,17576 - 0,43266 X_1 - 2,02004 X_2 + 11,56715 X_3 + 0,00238 X_1^2 + 0,05580 X_2^2 - 2,22196 X_3^2 + 0,00252 X_1 X_2 + 0,01904 X_1 X_3.$	0,7765
% redução do ABTS	$Y = 41,98505 - 0,3811 X_1 - 2,68153 X_2 + 7,13112 X_3 + 0,00155 X_1^2 + 0,06009 X_2^2 - 1,27397 X_3^2 + 0,00983 X_1 X_2.$	0,7930

O gráfico de Pareto para as variáveis independentes mostrou efeito significativo das funções lineares, quadráticas e de interação entre tempo e razão massa:volume sobre a variável dependente carotenoides totais (Figura 1), sendo o principal efeito relacionado ao tempo de extração. A Figura 2 apresenta as superfícies de resposta para carotenoides totais, % de redução do DPPH e % de redução do ABTS. Observa-se que quando o tempo foi utilizado em seus níveis superiores, houve uma maior obtenção de carotenoides, independente da relação massa:volume e do número de extrações.

O número de extrações, assim como no planejamento fracionário, apresentou efeito negativo no resultado. Na Figura 2 pode-se observar que a concentração de carotenoides é menor tanto nos níveis inferiores do fator número de extração quanto nos níveis superiores deste fator, sugerindo que sejam considerados como melhores os valores centrais. A maioria dos estudos encontrados que realizaram planejamento para obtenção de carotenoides encontrou efeito positivo para o número de extrações (NUNES e MERCADANTE, 2004; KAUR et al., 2008; STRATI e OREOUPLOU, 2011 b). O resultado deste trabalho pode ser explicado pelo maior número de extrações relacionarem-se a um maior número de etapas durante a extração e, conseqüentemente, perda de carotenoides durante estas etapas.

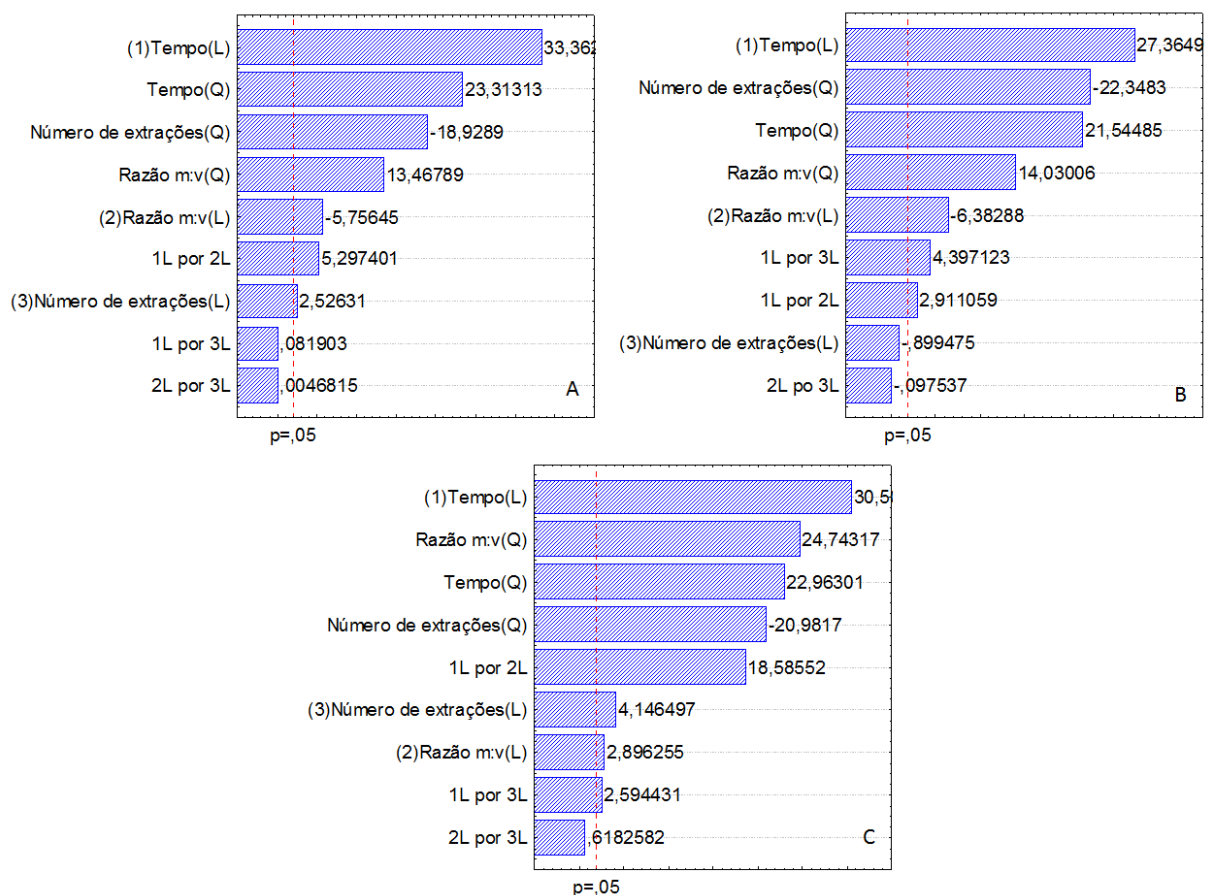


Figura 1 - Gráficos de Pareto para os efeitos dos fatores estudados no planejamento composto central 2^3 sobre as repostas (A) carotenoides totais, (B) % de redução do DPPH e (C) % de redução do ABTS.

Os melhores resultados para a obtenção de carotenoides foram obtidos nas condições dos ensaios 5 a 11 (94,39 a 99,91% de obtenção em relação ao convencional). Considerando a realização de extração com menor tempo, gasto de solvente e número de etapas, foi realizada uma comparação entre estes ensaios, apontando-se como melhor condição do planejamento para a resposta “carotenoides totais” o ensaio 5, com relação massa:volume de 0,5:10 g/mL e 2 extrações de 120 min., que obteve 94,39% de carotenoides em relação ao método convencional.

Nunes e Mercadante (2004) observaram três pontos na região ótima de obtenção de licopeno, com diferentes condições: 4 extrações de 120 minutos, 7 extrações de 120 minutos e 6 extrações de 180 minutos, obtendo-se cerca de 100 μ g de licopeno/g de tomate esterilizado. A primeira condição foi escolhida como melhor, por menor tempo total de análise e o menor gasto de solvente.

Da mesma forma, Mendonça (2013), encontrou melhor rendimento na extração de carotenoides, a partir da microalga *Spirulina platensis*, em três experimentos: (256,15 μ g/g; relação massa:volume 0,5:20 g/mL e 6 extrações de 40 min. a 30°C),

(257,44 $\mu\text{g/g}$; relação massa:volume 0,5:20 g/mL e 6 extrações de 40 min. a 40°C) e pontos centrais (250.71 $\mu\text{g/g}$; relação massa:volume 0,5:15 g/mL e 5 extrações de 30 min. a 35°C), sendo este escolhido como melhor, por atingir percentual similar com os demais em menor tempo total de análise e menor gasto de solventes.

Através do teste de Kruskal-Wallis, foi rejeitada a hipótese de que a distribuição de carotenoides totais seja a mesma em todos os experimentos ($p < 0,05$). Assim, o ensaio cinco foi comparado ao convencional através do teste de Mann-Whitney. Não houve diferença estatística significativa entre o conteúdo de carotenoides totais nos dois extratos, sendo o ensaio cinco definido como o ponto ótimo para obtenção de carotenoides a partir da folha externa do repolho.

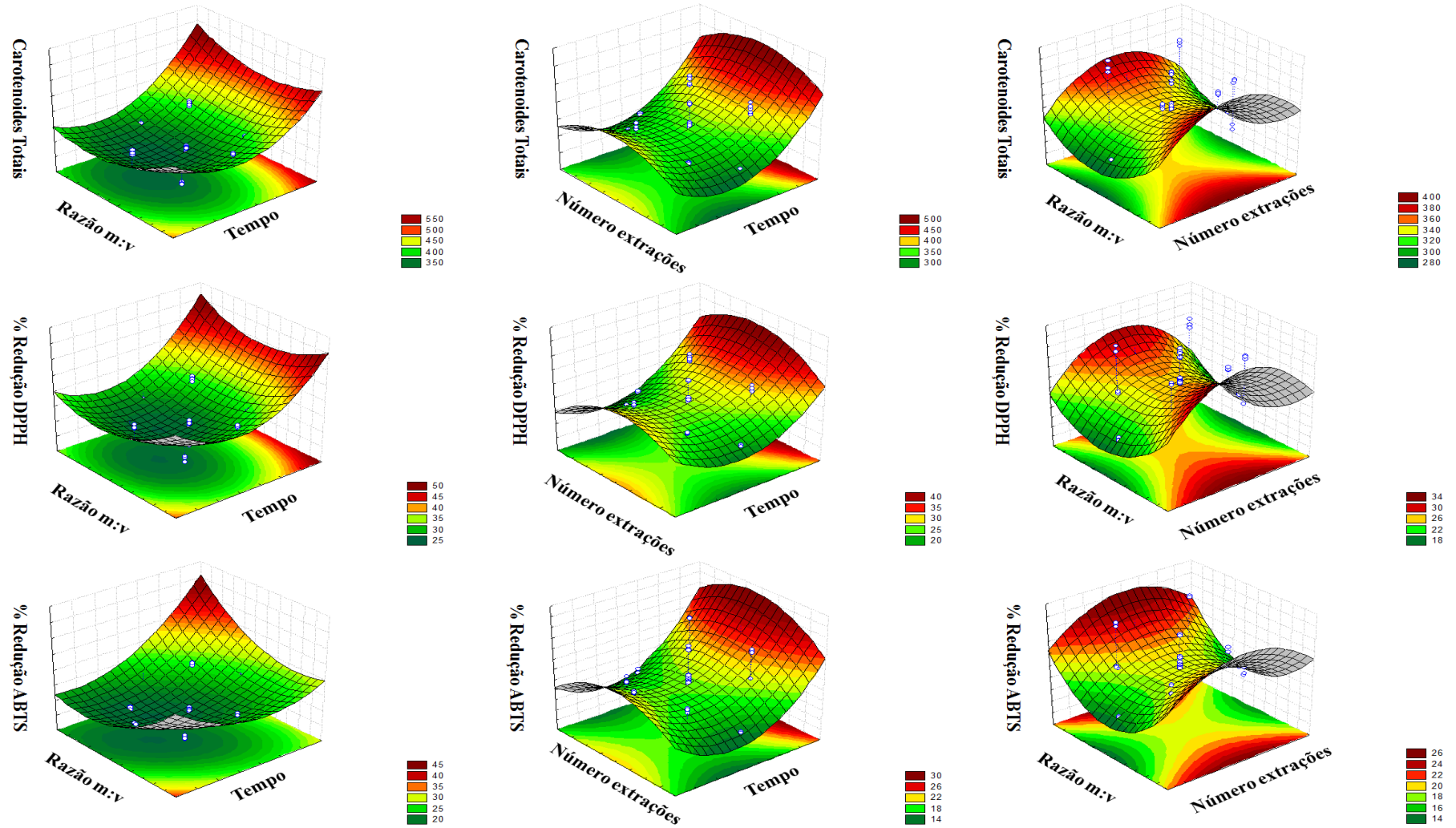


Figura 2 – Superfícies de resposta para os resultados do planejamento composto central 2^3 sobre as repostas: carotenoides totais, % de redução do DPPH e % de redução do ABTS.

3.2. ANÁLISE DOS CAROTENOIDES POR CLAE

A composição dos extratos de carotenoides obtidos a partir da extração convencional (Figura 3A) e da condição ótima (Figura 3B) foi determinada por CLAE. O *all-trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário nos dois extratos, seguido de luteína, sendo seu teor maior no extrato obtido pelo método convencional, enquanto o conteúdo de luteína foi maior na condição ótima do planejamento (Tabela 5).

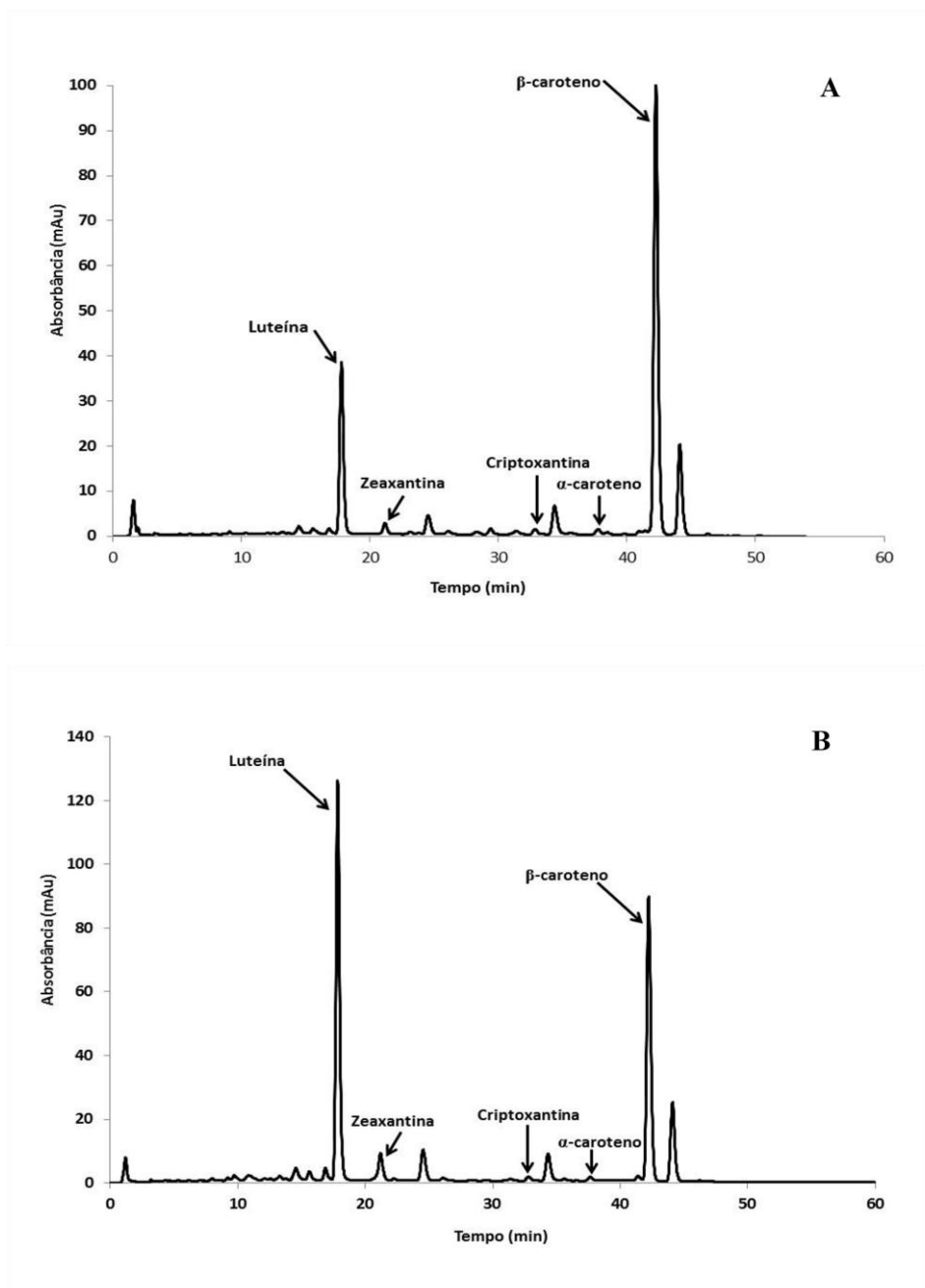


Figura 3 – Cromatogramas dos extratos de carotenoides, obtidos por CLAE, para extração realizada de acordo com (A) método convencional e (B) condição ótima do planejamento.

A diferença na composição dos carotenoides está principalmente relacionada ao tipo de solvente utilizado nos diferentes métodos. Por serem hidroxiladas, a luteína e

zeaxantina foram melhores extraídas pelo etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$), enquanto o β -caroteno, menos polar, foi melhor extraído pela acetona ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$) (KHOO et al. 2011; STRATIE OUREOUPOLU, 2014).

Tabela 5 – Carotenoides identificados por HPLC obtidos no ponto ótimo do planejamento e a partir da extração convencional.

	all- <i>trans</i> - β - caroteno	Luteína	Zeaxantina	Criptoxantina	all- <i>trans</i> - α - caroteno
Convencional ($\mu\text{/g}$)*	351,80 \pm 1,56 ^a	49,18 \pm 5,62 ^a	7,14 \pm 0,34 ^a	11,23 \pm 0,51 ^a	3,74 \pm 0,38 ^a
Ensaio 5 ($\mu\text{/g}$)*	324,91 \pm 5,35 ^b	169,57 \pm 1,26 ^b	20,41 \pm 0,90 ^b	11,22 \pm 0,06 ^a	4,22 \pm 0,02 ^a

* $\mu\text{/g}$ de carotenoide em peso seco. Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Teste t de Student.

Nachtigall *et al.* (2007) compararam o teor de luteína extraído em diversas hortaliças por diferentes solventes (acetona, etanol, hexano e tetraidrofurano). Como neste trabalho, verificou-se que a composição qualitativa dos extratos permaneceu constante com variações quantitativas no perfil de carotenoides dos mesmos, que foram dependentes do solvente utilizado, com maiores concentrações de luteína para o etanol e acetona, a depender da hortaliça.

3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE OXIDATIVA

3.3.1. Determinação da atividade antioxidante através da captura do radical DPPH

A variável dependente, % de redução do DPPH, apresentou comportamento semelhante à variável conteúdo de carotenoides, sendo maior a redução do DPPH nos ensaios em que foi maior o conteúdo de carotenoides totais. O valor do R^2 para esta resposta foi de 0,7765, indicando que 77,65% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo (Tabela 5). O gráfico de Pareto (Figura 1) mostrou efeito significativo das funções lineares, exceto para número de extrações, quadráticas, e de interação entre tempo e razão massa:volume e entre tempo e número de extrações.

As superfícies de resposta (Figura 2), assim como para carotenoides totais, indicam os valores máximos de redução de DPPH quando o fator tempo está em seus níveis superiores. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparar a % de redução de DPPH entre o ensaio cinco e convencional, a fim de verificar se a escolha do ensaio cinco como ponto ótimo se aplicava também a esta resposta.

Os valores de % de redução do DPPH variaram entre 19,84 e 33,05%, sendo de 30,88% para o ensaio cinco e de 32,06% para a extração convencional, não sendo verificada diferença estatística significativa entre os mesmos pelo teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$) (Tabela 1). Hernández-Ortega et al. (2012) estudaram a atividade antioxidante de extratos de carotenoides de pimenta seca através do radical DPPH. A porcentagem de inibição variou de 12,3 a 24,2% a depender da variedade da pimenta. Uma possível explicação para a maior atividade antioxidante de uma variedade foi atribuída à maior quantidade de *all-trans*- β -caroteno e criptoxantina, indicando que essa é influenciada pelo tipo e quantidade de carotenoides.

Fu et al. (2011), ao avaliarem a atividade antioxidante dos principais carotenoides de espinafre (violaxantina, luteína e β -caroteno), concluíram que os resultados estabeleceram o potencial antioxidante destes carotenoides como possíveis responsáveis pela atividade de limpeza de radicais livres desse vegetal na dieta. O β -caroteno foi considerado o mais eficiente na eliminação do radical DPPH, com aproximadamente 75% de inibição, seguido da violaxantina (aproximadamente 60%) e luteína (aproximadamente 50%).

Neste trabalho, observou-se uma diferença quantitativa entre os carotenoides majoritários dos extratos obtidos através do ensaio cinco e pela metodologia convencional. Entretanto, não foi verificada diferença na porcentagem de inibição do DPPH entre ambos os extratos, possivelmente, porque a atividade antioxidante é maior para o β -caroteno, e as diferenças de composição foram maiores para a luteína e zeaxantina.

3.3.2. Determinação da atividade antioxidante através da captura do radical ABTS

Os resultados para o ensaio do ABTS apresentaram resultados que variaram entre 13,53% de redução e 25,47%. Da mesma forma que para o resultado da atividade antioxidante através do radical DPPH, não houve diferença estatística significativa entre o resultado de redução do radical pelo extrato obtido no ensaio cinco e pela metodologia convencional.

Prasad et al. (2011) utilizaram o ensaio de redução do ABTS para avaliação do poder antioxidante dos carotenoides extraídos da pele, polpa e semente do fruto de *Canarium odontophyllum*, fruto indiano de polpa amarela e sabor comparado ao do abacate. Como resultado, o pigmento que apresentou maior correlação com a atividade

de redução do ABTS foi o β -caroteno, exercendo a maior atividade antioxidante no ensaio, que variou de 18,3 a 44,5 % na polpa, a depender da concentração de carotenoides. Segundo Fu et al. (2011), a atividade antioxidante do β -caroteno no ensaio ABTS aumenta consideravelmente com o aumento da concentração deste, resultados que corroboram com o encontrado neste estudo, já que não houve diferença significativa entre a atividade antioxidante dos extratos comparados (ensaio cinco e convencional), possivelmente relacionados ao conteúdo de β -caroteno, que apesar de diferir de forma significativa, não apresentou teores muito diferentes entre os extratos.

O valor de R^2 para o modelo da % de redução do ABTS foi 0,7930, explicando 79,30% da variabilidade na resposta. O gráfico de Pareto para as variáveis independentes mostrou efeito significativo das funções lineares, quadráticas e de interação exceto para a interação entre os fatores razão massa:volume e número de extrações (Figura 1). Assim como nos demais modelos, o principal efeito foi o tempo, que quando em seus níveis superiores, proporcionou maior porcentagem de redução de ABTS, assim como para as respostas carotenoides totais e porcentagem de redução do DPPH.

3.3.3. Oxidação acelerada em Rancimat

Através do teste de Kruskal-Wallis foi possível verificar que não houve diferença estatística entre os valores de tempo de indução para os diferentes ensaios do planejamento composto central e extração convencional ($p > 0,05$) (Tabela 1). Ao comparar os valores de tempo de indução para o óleo de palma sem antioxidante, com adição dos extratos de carotenoides e com TBHQ, foi observada diferença estatística significativa apenas entre o óleo com TBHQ e os demais (Tabela 6).

Tabela 6 – Tempo de indução do óleo de palma refinado sem antioxidantes, com extratos de carotenoides da folha externa de repolho, e com TBHQ.

Óleo de palma	Tempo de Indução
Controle	12,30 \pm 0,53 ^a
Óleo + extrato I	13,01 \pm 0,14 ^a
Óleo + extrato II	12,65 \pm 0,13 ^a
Óleo + TBHQ	16,66 \pm 0,68 ^b

Controle: óleo de palma refinado; Extrato I: extração convencional; Extrato II: ensaio 5. Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$). ANOVA

O óleo de palma refinado foi escolhido para ser utilizado nestes experimentos por sua extensa aplicação na indústria de alimentos, sendo considerado bastante estável

ao aquecimento. Dentre os antioxidantes sintéticos mais usados em alimentos, está o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), geralmente considerado o mais eficaz, principalmente em óleos vegetais, pois resiste ao calor, não altera o sabor ou o cheiro do material e pode ser utilizado em menor concentração, resultado compatível com o deste estudo.

Os extratos de carotenoides não apresentaram efeito protetor como antioxidantes durante o processo de oxidação acelerada em Rancimat, pois não diferiram estatisticamente do controle. Zeb e Murcovic (2010, 2011, 2013a, 2013b), ao utilizarem o Rancimat para analisar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais adicionados de β -caroteno (300 $\mu\text{g/g}$) verificaram que a concentração deste diminuiu em função do tempo de aquecimento, sendo degradado nas primeiras horas (3-5 horas) de tratamento térmico. Quando comparada a estabilidade do β -caroteno e da astaxantina (300 $\mu\text{g/g}$) em azeite de oliva, esta foi degradada mais lentamente (ZEB e MURCOVIC, 2011).

Os óleos vegetais utilizados nos experimentos relatados acima foram mais estáveis durante o tratamento térmico na presença de β -caroteno quando o mesmo apresentava em sua composição outras substâncias, tais como: tocoferóis, ácido oléico, compostos fenólicos, dentre outras, visto que podem atuar sinergicamente com este pigmento retardando a oxidação lipídica.

3.4. COR

Os valores dos parâmetros de cor dos extratos obtidos a partir do planejamento composto central e da extração convencional estão apresentados na Tabela 3. Os valores de L^* variaram de 60,72 a 62,48, indicando que os extratos apresentaram luminosidade tendendo ao branco. O parâmetro a^* variou de -4,30 a -6,12, valores que estão localizados no segundo quadrante do espaço CIELAB, enquanto o parâmetro b^* variou de 14,78 a 22,33, valores localizados no primeiro quadrante. A localização conjunta dos parâmetros a^* , b^* e L^* indica a cor amarela com alta luminosidade.

Meléndez-Martínez et al. (2007) estudaram o comportamento de diversos padrões de carotenoides através do sistema CIELAB. Os carotenoides vermelhos, licopeno e cantaxantina, foram localizados no primeiro quadrante do plano (valores positivos de a^* e b^*), enquanto os demais ficaram no segundo quadrante próximo do eixo b^* (valores negativos de a^* e positivos de b^*), portanto apresentam coloração mais amarelada, como no caso dos carotenoides majoritários deste estudo.

A cor influencia diretamente na aparência do alimento, um dos fatores mais avaliados pelos consumidores na escolha destes (PATHARE, OPARA e AL-SAID, 2013). A obtenção de carotenoides é uma vantagem para a indústria de alimentos, pois os mesmos podem ser utilizados como antioxidantes naturais, na produção de alimentos funcionais, além de serem largamente utilizados como corantes em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais, principalmente de aves e peixes (SHI et al., 2013; WANG et al., 2007). Gradativamente, as indústrias de alimentos e farmacêuticas vêm buscando substituir os corantes sintéticos por naturais devido ao maior apelo do produto natural (VALDUGA et al., 2009).

4. CONCLUSÃO

A condição ótima de obtenção de carotenoides foi definida a partir dos planejamentos realizados, constando de amostra esterilizada, relação massa:volume de 0,5:10 g/mL e 2 extrações com etanol de 120 min a 30°C com saponificação simultânea, representando 94,39% do obtido no convencional, com menor tempo de análise e volume de solvente.

O *all-trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário nos dois extratos, seguido de luteína, sendo seu teor maior no extrato obtido pelo método convencional, devido ao uso da acetona como solvente, enquanto o conteúdo de luteína foi maior na condição ótima do planejamento em que foi utilizado etanol.

A atividade antioxidante dos extratos obtidos através do planejamento e extração convencional nos ensaios DPPH e ABTS não apresentou diferença significativa, no entanto, os mesmos não tiveram efeito protetor sobre o óleo de palma refinado nas condições de oxidação acelerada em Rancimat.

A folha externa do descarte de repolho, um produto sem valor comercial, que normalmente não é utilizado para consumo humano, apresentou-se como uma potencial fonte de obtenção de carotenoides, predominantemente de *all-trans*- β -caroteno e de luteína, produtos de alto valor agregado, com possibilidade de aplicação na indústria de alimentos em processos de fortificação e/ou como corantes e antioxidantes naturais, devendo, para isso, ser testados em matriz alimentícia na ausência de oxigênio e de temperaturas elevadas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento do projeto “Tecnologias de aproveitamento de descartes vegetais: integrando saúde, sustentabilidade e desenvolvimento social, junto a comunidades vulneráveis de Salvador-BA” – PET0015/2013 e Auxílio Dissertação – APR0218/2014, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

6. REFERÊNCIAS

21 CFR 184.1293 Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe. Listing of Specific Substances Affirmed as GRAS. Ethyl alcohol. Code of Federal Regulations Title 21, Part 184, Subpart B, Section 184.1293, Revised April 1, 2012. Disponível em: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&sid=786bafc6f6343634fbf79fcdca7061e1&rgn=div5&view=text&node=21:3.0.1.1.14&idno=21#se21.3.184_11293. Acesso em: 12 de novembro de 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-Wiss Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, p. 466-488, 2014.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228–265, 2004.

FU, H. et al. Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatica*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 288–297, 2012.

GUZMAN, I.; YOUSEF, G. G.; BROWN, A. F. Simultaneous Extraction and Quantitation of Carotenoids, Chlorophylls, and Tocopherols in Brassica Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7238–7244, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, M. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum L.*). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 10p., 2012.

HIRANVARACHAT, B. et al., Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of β -carotene from carrots. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 190–197, 2013.

ISHIDA, B. K.; CHAPMAN, M. H. Effects of a hydrodynamic process on extraction of carotenoids from tomato. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1156–1160, 2012.

KAMFFER, Z. K.; BINDON, K. A. OBERHOLSTER, A. Optimization of a Method for the Extraction and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls during Ripening in Grape Berries (*Vitis vinifera* cv. *Merlot*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6578–6586, 2010.

KAO, F.-J.; CHIU, Y.-S.; CHIANG, W.-D. Effect of water cooking on antioxidant capacity of carotenoid-rich vegetables in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 202–209, 2014.

KAUR, D. et al. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 711–718, 2008.

KAULMANN et al. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 155, p. 240–250, 2014.

KHOO, H. et al. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1710–1738, 2011.

MARZ, U. The global market for carotenoids. Technical Report FOD025D. **Business Communications Company**, Inc. Norwalk, CT, 2011. Disponível em: [http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-\\$1.4-billion-2018](http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-$1.4-billion-2018). Acesso em 24 de março de 2014.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; BRITTON, G.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145–1150, 2007.

MENDONÇA, T. A.; **Carotenoides da microalga *Spirulina platensis*: obtenção e avaliação da atividade antioxidante** (Dissertação). Salvador: Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2014.

NACHTIGALL, A. M. Determinação do teor de luteína em hortaliças. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 181–192, 2007.

NUNES, I. L., MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 440–447.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 36–60, 2013.

PRADO, J. M.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, A. A. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables – Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 29–66, 2014.

PRASAD, K. N. et al. Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1549–1555, 2011.

- RÉ, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- REIF, C. et al. Carotenoid database of commonly eaten Swiss vegetables and their estimated contribution to carotenoid intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 64–72, 2013.
- RIGGI, E. Recent Patents on the Extraction of Carotenoids. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v.2, p.75-82, 2010
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press, 2001, p.64.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 99 p.
- SHI, X. et al. Effect of modifier on the composition and antioxidant activity of carotenoid extracts from pumpkin (*Cucurbita maxima*) by supercritical CO₂. **Food Science and Technology**, v. 51, p. 433-440, nov. 2013.
- SKIBSTED, L. H. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2409–2417, 2012.
- STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 23–29, 2011a.
- STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 747–752, 2011b.
- STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. **Food Research International**, v. 65, p. 311–321, 2014.
- VALDUGA, E. et al., Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, out. 2009.
- WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36–41, 2007.
- ZANATTA, C. F. e MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.
- ZEB, A.; MURKOCIC, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of β -carotene in corn oil triacylglycerols. **Food Research International**, v. 150, p. 534-544, 2013b.

ZEB, A.; MURKOCIC, M. Pro-oxidant effects of β -carotene during thermal oxidation, of edible oils. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 90, p. 881-889, 2013a.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1584-1593, 2011.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Characterization of the effects of β -carotene on the thermal oxidation of triacylglycerols using HPLC-ESI-MS. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1218-1228, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

A obtenção e quantificação dos carotenoides a partir de vegetais vêm sendo bastante estudadas nos últimos anos, devido aos efeitos benéficos desses pigmentos na saúde humana em conjunto ao crescente interesse da indústria e dos consumidores por produtos naturais, e que utilizem menores quantidades de solventes orgânicos. Assim, dentre esses estudos, é possível perceber a necessidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas e condições adequadas de extração dos carotenoides nos diversos vegetais.

O ponto ótimo de obtenção de carotenoides definido a partir dos planejamentos realizados utilizou a amostra esterilizada, temperatura de 30°C, relação massa:volume de 0,5:10 g/mL e 2 extrações de 120 min, atingindo 94,39% do conteúdo obtido pelo método convencional, com menor tempo de extração, saponificação simultânea, menor gasto de solventes e uso de solvente GRAS. Dentre os fatores estudados no planejamento composto central, todos foram significantes, sendo o tempo de extração o mais importante.

O *all-trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário nos dois extratos, seguido de luteína, sendo seu teor maior no extrato obtido pelo método convencional, devido ao uso da acetona como solvente, enquanto o conteúdo de luteína foi maior na condição ótima do planejamento em que foi utilizado etanol.

A atividade antioxidante dos extratos obtidos através do planejamento e extração convencional nos ensaios DPPH e ABTS não apresentou diferença significativa, no entanto, os mesmos não tiveram efeito protetor sobre o óleo de palma refinado nas condições de oxidação acelerada em Rancimat.

A folha externa de repolho, um produto sem valor comercial, que normalmente não é utilizado para consumo humano, apresentou-se como uma potencial fonte de obtenção de carotenoides, predominantemente de *all-trans*- β -caroteno e de luteína, produtos de alto valor agregado, com possibilidade de aplicação na indústria de alimentos em processos de fortificação e/ou como corantes e antioxidantes naturais, devendo, para isso, ser testados em matriz alimentícia na ausência de oxigênio e de temperatura elevada.