

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Química
Mestrado em Química

Harlem Vieira Castro

**Estudo Vibracional de Carotenóides em Amostras Biológicas e em Complexos de
Inclusão com Ciclodextrinas**

Juiz de Fora
2010

Harlem Vieira Castro

**Estudo Vibracional de Carotenóides em Amostras Biológicas e em Complexos de
Inclusão com Ciclodextrinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Juiz de Fora
2010

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Mauro e Nilva e a meu irmão Gledson.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela plenitude da minha vida.

A toda minha família, principalmente meus pais e meu irmão, pela confiança, compreensão e incentivo depositados em mim. Obrigado por tudo!!!

Aos meus queridos avós, Celina e Geraldo por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao meu orientador, educador e amigo, Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira que proporcionou de forma íntegra um grande aprendizado científico e pessoal. Obrigado por permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa (NEEM – Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular) e por toda assistência dedicada.

A minha amiga Vanessa, ou melhor, *End*, que com sua gentileza e conhecimento esteve sempre disponível em ajudar. Obrigado por estar sempre presente nesta trajetória acadêmica e de proporcionar fundamental contribuição na confecção deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório Cadu, pelos conselhos e dicas; ao Betinho, pela parceria e disponibilidade em ajudar; ao Douglas (*ice man*) e Mariana que sempre estiveram presentes nesta longa caminhada.

A toda família NEEM, Renata, Tatiana, Laís (*hello*), Charlane, Vandinha,, Elgte, Victor, Luciano, Maria Clara e Lívia, enfim todos aqueles que de alguma forma me apoiaram.

Aos companheiros Lippy, Diego (*Shrek*), Mateus, Rafael Dornellas, Leo, Raphael Alvim e Gustavo, pelas conversas acadêmicas, momentos de descontração e sábios conselhos de vida.

Em especial à Fabrícia, pelas palavras de incentivo e confiança.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Juiz de Fora por toda infraestrutura e apoio financeiro oferecido.

Agradeço ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), juntamente com a Petrobras pelo dinheiro concedido.

Às agências financiadoras CNPq e FAPEMIG.

*“Não há ventos favoráveis àqueles
que não sabem até onde navegar...”*

FERNANDO PESSOA.

“A utopia está no horizonte. Caminho dois passos, ela se distancia dois passos e o horizonte fica dez passos ainda mais distante. Então para que serve a utopia ? Para isso, serve para caminhar ! ... ”

EDUARDO GALEANO.

Resumo

Estudos por espectroscopia Raman de uma variedade de carotenóides de ocorrência natural (aproximadamente cinquenta espécies) e um conjunto de seis padrões foram realizados. As principais bandas características de estiramento C=C e C-C bem como a deformação C-CH₃ foram devidamente atribuídas. Uma comparação dos dados espectroscópicos com a atribuição química dos carotenóides revelaram que existe um problema na interpretação dos dados espectroscópicos que pode ser atribuído a um significativo deslocamento de número de onda, particularmente no modo de estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$, referente às interações moleculares entre os carotenóides e sua matriz hospedeira. A simples identificação de carotenóides em tecidos biológicos através da comparação com o espectro padrão do material extraído deve ser feita com cautela. O progressivo deslocamento no número de onda referente, principalmente a banda de estiramento C=C na cadeia poliênica conjugada, com o número do grupos C=C, e portanto a identificação de carotenóides, não pode ser interpretado de forma inequívoca para a variedade de materiais estudados aqui.

Para demonstrar como o ambiente químico pode influenciar nos dados espectroscópicos dos carotenóides, um trabalho complementar, utilizando a β -ciclodextrina como matriz, foi elaborado.

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos hóspede/hospedeiro com moléculas hidrofóbicas, dada a natureza singular que apresenta sua estrutura. A estabilização dos carotenóides, licopeno, β -caroteno, astaxantina, capsantina e norbixina, através do um processo de inclusão com a β -ciclodextrina (β -CD), foi devidamente caracterizado por espectroscopia Raman. As análises espectroscópicas das bandas de estiramento C=C e C-C dos carotenóides encapsulados, demonstraram claramente que há um deslocamento significativo no número de onda quando comparado com os carotenóides em sua forma livre, evidenciando que a matriz é um fator muito importante a ser considerado na análise de bandas Raman de carotenóides.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman. Carotenóides. Ciclodextrinas.

Abstract

Raman spectroscopic studies of a range of naturally occurring carotenoids in over 50 specimens of plant tissue and a range of standard extracts have been undertaken, and the characteristic bands of C=C and C–C stretching as well as C–CH₃ bending have been recorded. Comparison of the spectroscopic data with the chemical assignment of the carotenoids obtained from chemical extraction of the plant tissues reveals that there is a problem in the interpretation of the spectroscopic data which can be attributed to significant wavenumber shifts, particularly in the C=C stretching band wavenumber, for carotenoids in the organic tissues arising from molecular interactions between the carotenoid and its host matrix. The simple identification of carotenoids in biological tissues on the basis of comparison with the standard spectra of extracted material must be made with caution; the progressive shift in wavenumber of the C=C stretching band in the conjugated polyene chain of carotenoids with the number of C=C groups, and hence the identification of the carotenoid, cannot be unambiguously interpreted for the range of materials studied here.

To demonstrate as the chemical environment may influence in the spectroscopic data of the carotenoids, another work using the β -cyclodextrin (β -CD) as a matrix, was done.

Cyclodextrins are known to be able to form host-guest complexes with hydrophobic molecules given the unique nature imparted by their structure. The stabilization of lycopene, β -carotene, astaxanthin, capsanthin, norbixin by encapsulation using β -cyclodextrin (β -CD) was determined by using Raman spectroscopy. The spectroscopic analysis of the C=C and C–C stretching bands from the encapsulated carotenoids clearly demonstrates that there is a significant shift in wavenumber when compared to the pure carotenoids, demonstrating the matrix is a very important factor to be considered in the analysis of the Raman bands of carotenoids.

Keywords: Raman Spectroscopy. Carotenoids. Cyclodextrins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Estruturas de carotenóides acíclicos e alicíclicos	16
Figura 1.2 Estruturas: (a) Estrutura química do isopreno (b) Estrutura do licopeno marcada com a posição central e os grupos metilas	16
Figura 1.3 Designação e numeração dos grupos finais	17
Figura 1.4 Estrutura de alguns oxicarotenóides	19
Figura 1.5 Reações entre carotenóides e radicais livres	20
Figura 1.6 Estrutura química: (a) Fitoeno(C3) e (b) Fitoflueno (C5).....	21
Figura 1.7 Imagem batata-baroa.....	21
Figura 1.8 Esquema demonstrativo da degradação de carotenóides	22
Figura 1.9 (a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD's). Os derivados α , β , e γ -CD são definidos por n=1, 2 e 3, respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's, mostrando as características definidas pelo arranjo das unidades de glicose	25
Figura 1.10 Exemplo de um processo de inclusão fármaco-CD em diferentes estequiometrias	26
Figura 1.11 Interações intermoleculares na cavidade da β - CD	26
Figura 2.1 Transição vibracional (Raman)	29
Figura 2.2 Espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes)	33
Figura 3.1 Representação da estrutura da β -ciclodextrina: a) no plano b) tronco-cônica.....	38
Figura 3.2 Amostra da β -CD comercializada da Sigma-Aldrich	38
Figura 3.3 Estruturas dos carotenóides utilizados no processo de inclusão.....	40
Figura 3.4 Representação esquemática do preparo dos complexos de inclusão	40
Figura 3.5 Reações para obtenção do carotenóide norbixina.....	42
Figura 4 Espectro Raman do β -caroteno	45
Figura 4.1 Espectros FT-Raman (a) polpa de banana, (b) semente de linhaça e (c) alho	52
Figura 4.2 Figure 4.2. Espectros FT-Raman dos padrões: (a) xantofila, (b) β -criptoxantina, (c) β -caroteno, (d) licopeno, (e) astaxantina e (f) zeaxantina	53
Figura 4.3 Espectros FT-Raman de: (a) cebola roxa, (b) batata doce, (c) espinafre, (d) alface manteiga, (e) polpa de abóbora e (f) casca de abóbora	54

Figura 4.4 Espectros FT-Raman (a) manga, (b) casca da laranja, (c) polpa de maracujá amarelo, (d) milho (e) milho processado e (f) nectarina	55
Figura 4.5 Espectro do purê de tomate (A), mostrando o tratamento de deconvolução do ombro entre 1500 e 1520 cm ⁻¹	57
Figura 4.6 Espectros FT-Raman (a) nos moscada (fruta), (b) guaraná (pó), (c) canela da china e (d) canela	58
Figura 4.7 Espectros FT-Raman (a) polpa de mamão, (b) beterraba, (c) damasco, (d) polpa de morango e (e) tomate	59
Figura 4.8 Espectros FT-Raman (a) pimenta verde e (b) pimenta vermelha.	60
Figura 4.9 Exemplo de inclusão de uma molécula (p-xileno) na CD em meio aquoso.	64
Figura 4.10 Espectro Raman dos complexos β -CD/carotenóides	66
Figura 4.11 Duplo encapsulamento	67
Figura 4.12 Espectros das misturas físicas a) β -CD+ β -caroteno, b) β -CD+astaxantina, c) β -CD+norbixina e d) β -CD+licopeno	68
Figura 4.13 Espectro da β -Ciclodextrina pura.	68
Figura 6.1 Imagens dos corais (a) <i>Leptogorgia punicea</i> b) <i>Chromonephthea braziliense</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Nomes triviais e sistemáticos de determinados carotenóides	18
Tabela 2 Ações biológicas e propriedades físico-químicas dos carotenóides	23
Tabela 3 Dimensões das CD's	25
Tabela 4 Amostras e seus respectivos nomes científicos	36
Tabela 5 Carotenóides padrões	37
Tabela 6 Posição do número de onda dos modos ν_1 , ν_2 e ν_3 (em cm^{-1}) dos carotenóides predominantes obtidos a partir de amostras naturais por espectroscopia Raman	46
Tabela 7 Posição dos números de onda dos modos de ν_1 , ν_2 and ν_3 (em cm^{-1}) de alguns carotenóides padrões obtidos por FT-Raman	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

R[•] - radical livre

CAR - carotenóide

CAR* - carotenóide no estado excitado

Δ - calor (aquecimento)

pH- Potencial Hidrogeniônico

hν- energia

H⁺ - ácido

OH⁻ - base

CD's - ciclodextrinas

IV - infravermelho

UV - ultravioleta

α - polarizabilidade eletrônica

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (High-performance liquid chromatography)

CCD - cromatografia em camada delgada

FT - transformada de Fourier

K_a - constante de estabilidade

SUMÁRIO

1	Introdução	15
1.1	NOMENCLATURA	17
1.2	CLASSIFICAÇÃO DOS CAROTENÓIDES	18
1.3	PROPRIEDADES DOS CAROTENÓIDES	18
1.3.1	Solubilidade	18
1.3.2	Antioxidante	20
1.3.3	Propriedades cromofóricas	20
1.3.4	Isomerização e Oxidação	22
1.3.5	Aplicação dos Carotenóides	23
1.4	COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CAROTENÓIDES	24
1.5	OBJETIVOS	27
2	FUNDAMENTOS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN	28
2.1	ASPECTOS TEÓRICOS	28
2.1.1	Espectroscopia Vibracional – Aspectos Gerais	28
2.1.2	O Efeito Raman	28
2.1.3	Polarizabilidade Eletrônica Molecular	30
2.1.4	Aproximação de Placzek	33
3	EXPERIMENTAL	36
3.1	AMOSTRAGEM	36
3.1.1	Amostras Naturais	36
3.1.2	Ciclodextrina	38
3.2	PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTAÇÃO	39
3.2.2	Ciclodextrina	39
3.2.2.1	Preparo dos Complexos de Inclusão	39
3.2.2.2	Extração da Norbixina	41
3.2.3	Instrumentação	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1	AMOSTRAS NATURAIS	44
4.1.1	Carotenóides em tecidos vegetais	44
4.2	ESPECTROS RAMAN DE AMOSTRAS REAIS	51
4.3	SISTEMAS SINTÉTICOS CONTENDO OLIGOSSACARÍDEOS	62

4.3.1 Complexos de Inclusão.....	62
5 CONCLUSÕES.....	70
6 PERSPECTIVAS.....	72
7 REFERÊNCIAS	73

1 Introdução

Carotenóides representam uma família de componentes naturais lipossolúveis que também podem ser esterificados ou complexados com proteínas (SU, *et al.*, 2002). Os carotenóides constituem o grupo de pigmentos orgânicos mais difundidos na natureza, são encontrados naturalmente em vegetais de folhas verdes, frutas vermelhas e amarelas, algumas raízes, sementes e alguns produtos de origem animal, como gema de ovo, leite e manteiga (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEASO, 2003). De maneira menos expressiva, estão presentes em organismos fotossintéticos, fungos, algas e bactérias, bem como em todos os grupos de animais, desde os protozoários até o homem (VILLELA, 1976).

A biossíntese dos carotenóides ocorre somente no reino vegetal, enquanto os animais apenas acumulam e/ou convertem precursores ingeridos através de alimentos que o contêm (FONTANA *et al.*, 2000). Por exemplo, o β -caroteno, que não é sintetizado pelos animais, é convertido em vitamina A, daí a enorme importância desse carotenóide para nutrição animal (VILLELA, 1976).

O nome carotenóide é derivado do nome científico da cenoura – *Daucus carote*, reconhecido por Wackenroder em 1831 como a primeira fonte de caroteno (GOODWIN, 1952). Atualmente, mais de 650 variantes estruturais foram reportadas e caracterizadas em bactérias, algas, fungos e plantas superiores (FONTANA *et al.*, 2000).

Segundo Honsang (HONSANG, 2001), a maioria destes pigmentos são quimicamente definidos como tetraterpenóides, lembrando que os terpenos são classificados de acordo com o número de unidade C_5 : monoterpenos, C_{10} ; sesquiterpenos, C_{15} ; diterpenos, C_{20} ; sesterpenos, C_{25} ; triterpenos, C_{30} ; e tetraterpenos, C_{40} . Ou seja, os carotenóides apresentam uma cadeia de quarenta átomos de carbono (exceto a crocetina e a bixina), podendo ser acíclicos ou alicíclicos (Figura 1). São formados por oito unidades isoprenóides (Figura 1.2a) unidos pela ligação “cabeça-cauda”, exceto na posição central, onde a ligação é do tipo “cauda-cauda” (PFANDER, 1987), produzindo uma estrutura simétrica com reversão do plano de simetria no centro da molécula e os dois grupos metílicos centrais encontram-se separados por seis átomos de carbono e os demais por cinco. A Figura 1.2b mostra detalhadamente essas características.

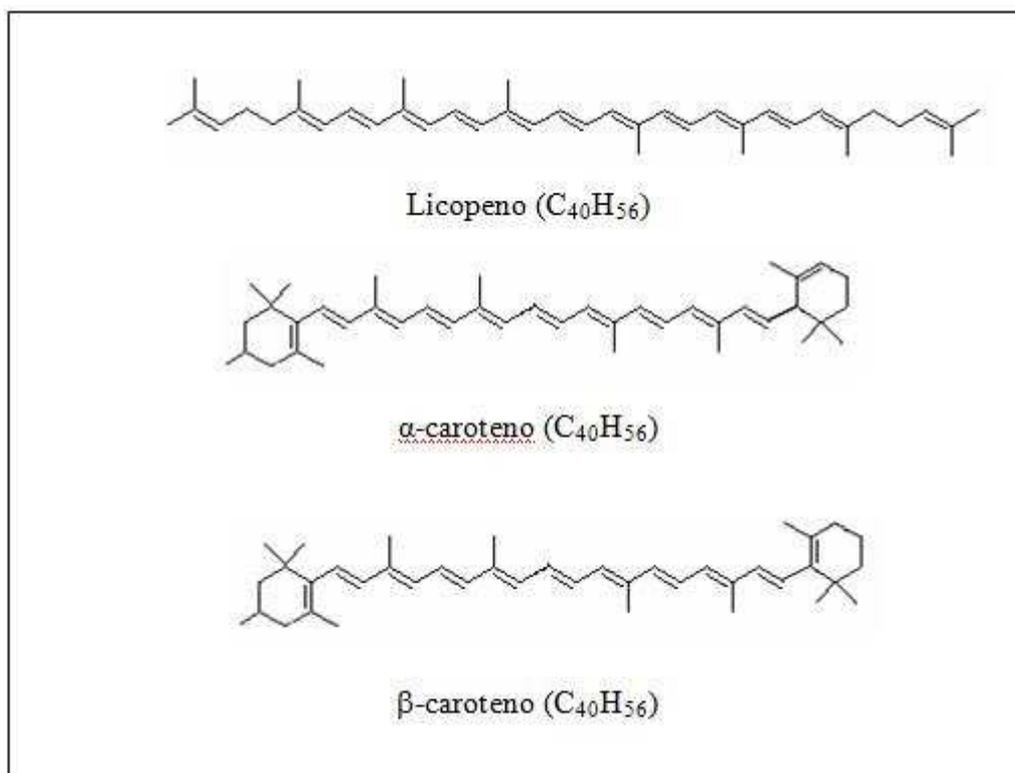


Figura 1.1 Estruturas de carotenóides acíclicos e alicíclicos.

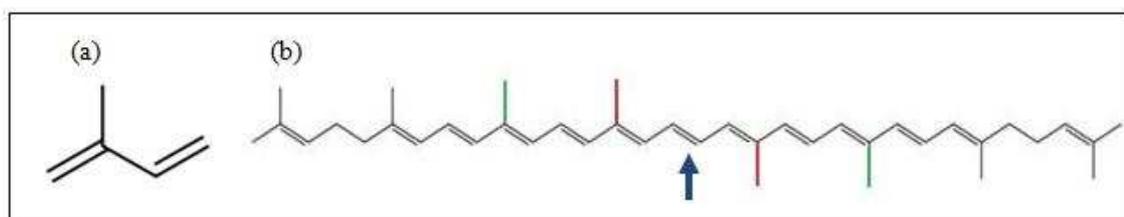


Figura 1.2 Estruturas: (a) Estrutura química do isopreno (b) Estrutura do lycopeno marcada com a posição central e os grupos metilas.

Esta grande multiplicidade de carotenóides deve-se às diferentes modificações da estrutura básica que ocorre através de hidrogenação, desidrogenação, ciclização,

migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinação destes processos resultando em uma enorme diversidade de estruturas. Estima-se que a quantidade de carotenóides produzida por ano na natureza pode alcançar milhões de toneladas (KULL *et al.*,1995).

1.1 Nomenclatura

Carotenóides comuns possuem nomes triviais bem estabelecidos, mas também existe a nomenclatura semi-sistemática recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

São formados pelo nome originário “caroteno” prefixadas de duas letras gregas, que indicam os dois grupos finais da molécula. São colocadas sempre na ordem alfabética (i.e. $\beta, \gamma, \epsilon, \kappa, \phi, \chi, \psi$) onde a primeira é separada da segunda por uma vírgula, e a segunda é unida por um hífen ao nome originário. A Figura 1.3 apresenta as designações dos grupos finais, bem como, a numeração dos carbonos destes grupos e os da cadeia poliênica que compõe uma molécula carotenóide. Exemplificando, a Tabela 1 mostra alguns nomes triviais e seus respectivos nomes semi-sistemáticos.

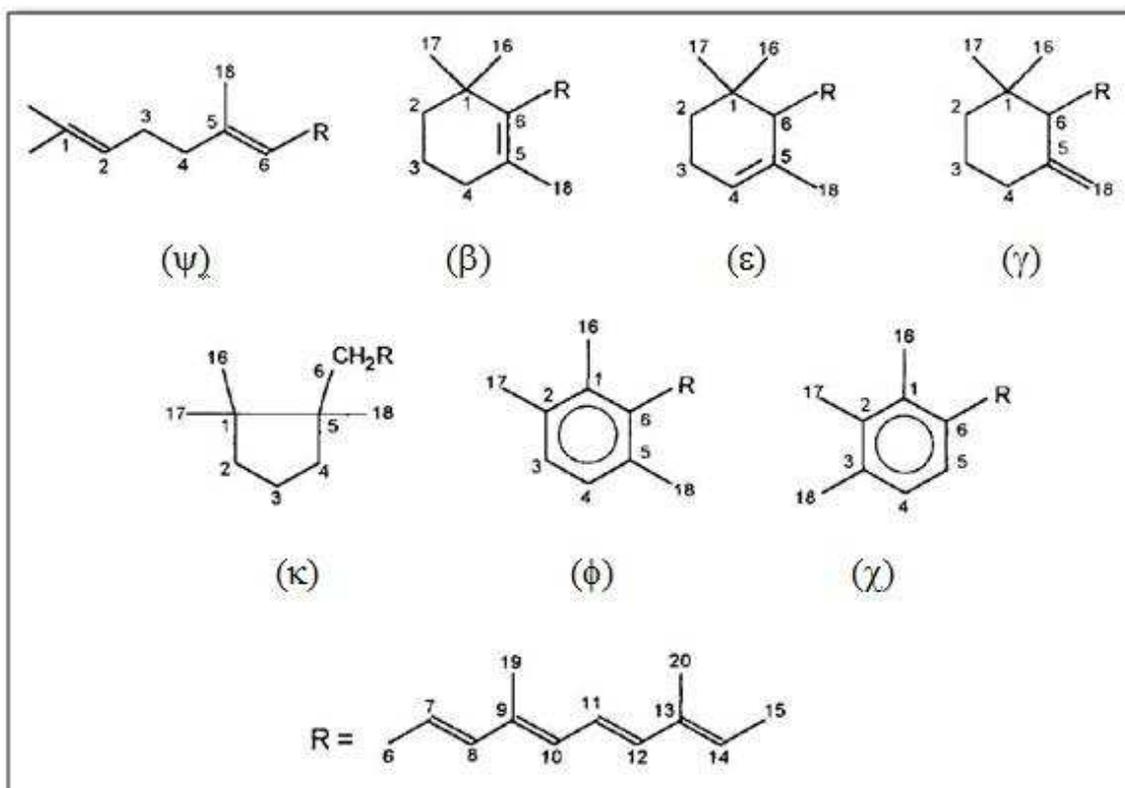


Figura 1.3. Designação e numeração dos grupos finais.

Tabela 1. Nomes triviais e sistemáticos de determinados carotenóides.

Nome Trivial	Nome Sistemático
α -Caroteno	β,ϵ -caroteno
β -caroteno	β,β -caroteno
Licopeno	ψ,ψ -caroteno
Zeaxantina	β,β -caroteno-3,3'-diol

(RODRIGUES-AMAYA, 2001)

1.2 Classificação dos Carotenóides

Nutricionalmente, os carotenóides podem ser classificados como pro - vitamínicos (aqueles com atividade pró-vitamina A) ou carotenóides inativos (aqueles que apresentam apenas atividade antioxidante ou corante) (OSLON, 1999^b).

Quimicamente, eles se dividem em dois grupos principais: hidrocarbonetos, os quais são chamados de carotenos, e os oxicarotenóides, que contem oxigênio além de carbono e hidrogênio, chamados de xantofilas (DAVIES, 1976). Os substituintes oxigenados mais comuns são os grupos epóxidos, hidroxí (monóis, dióis e polióis), metoxi (OMe) aldeídicos (CHO), cetônico (CO) e carboxílicos (RODRIGUES-AMAYA, 1997). A Figura 1.4 mostra alguns exemplos destes substituintes.

Dentre esses grupos, é interessante ressaltar os epóxidos, ou comumente chamado de epoxicarotenóides (RODRIGUES-AMAYA, 1997 e ANDRADE, 2003). Estes grupos são considerados produtos iniciais de degradação, uma vez que os carotenóides são muito instáveis. No item 1.3.4 será discutido com mais detalhes processos que podem causar algum tipo de degradação nos carotenóides.

1.3 Propriedades dos Carotenóides

1.3.1 Solubilidade

Os carotenóides são moléculas lipofílicas e, portanto, insolúveis em água. São capazes de ligar-se com superfícies hidrofóbicas e são solúveis, de modo variável, nos solventes orgânicos.

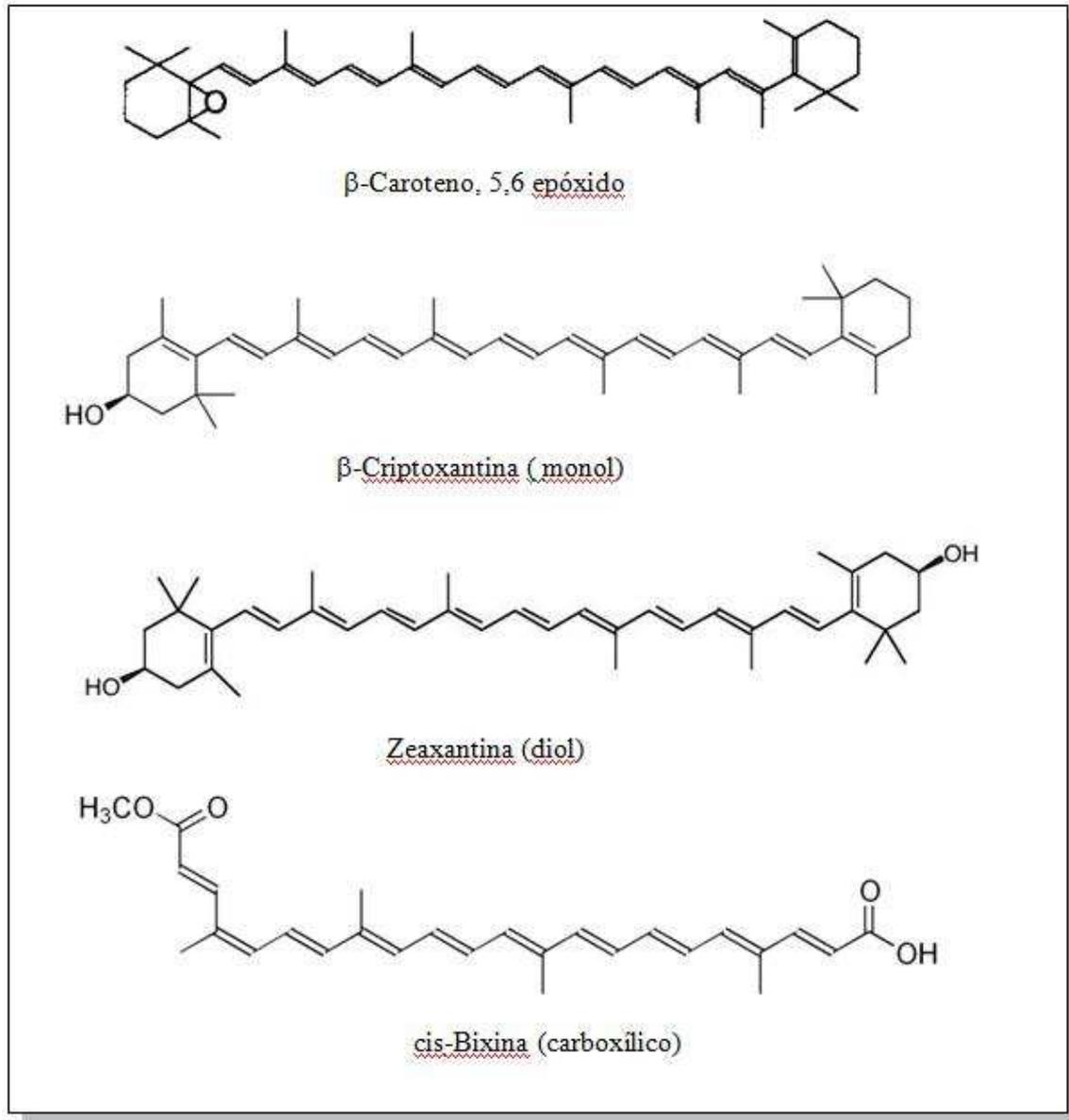


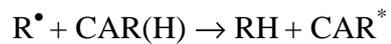
Figura 1.4. Estrutura de alguns oxicarotenóides.

São encontrados na natureza como soluções oleosas, dispersões coloidais ou complexados com proteínas (carotenoproteínas); assim ocorrem tanto em meios lipídicos como em meios aquosos. Os carotenóides são, portanto, comercializados como suspensões oleosas para alimentos à base de óleo, ou como emulsões ou estando dispersíveis em água. Nestas formulações, os carotenóides são fisicamente estabilizados, embora antioxidantes possam ser adicionados. As formulações comerciais de carotenóides são de dois tipos: extratos naturais e carotenóides sintéticos. (VILLELA, 1976 e ANDRADE, 2003).

1.3.2 Antioxidante

Os carotenóides apresentam propriedades antioxidantes, e são conhecidos por reagirem com o oxigênio singlete, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, o qual apresenta dois elétrons de spins opostos ocupando orbitais diferentes ou não. Os carotenóides protegem as células de danos oxidativos provocados por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio (moléculas não radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio). Assim são capazes de desempenhar um papel importante na prevenção de doenças associadas ao processo de estresse oxidativo como o câncer, catarata, arteriosclerose e retardo do processo do envelhecimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

Ao combater essas espécies reativas, os carotenóides podem interagir com os radicais livres e levar à transferência de elétrons e ou possíveis reações adicionais. O Esquema 1.4 exemplifica o modo de ação de um carotenóide frente a um radical livre.



Esquema 1.5. Ação de um carotenóide frente a um radical livre (adaptado)
(YOUNG e LOWE, 2001)

1.3.3 Propriedades cromofóricas

As cores são aspectos muito interessantes nos carotenóides. São provenientes de um cromóforo constituído de uma cadeia contendo duplas ligações conjugadas que são responsáveis pela sua habilidade de absorver luz na região do visível. Dependendo do número de insaturações conjugadas, o cromóforo absorve em regiões diferentes, e por sua vez resulta em um pigmento de cor diferente. Por exemplo, carotenóides com menos de sete duplas ligações conjugadas, como o fitoeno e o fitoflueno, são incolores (RODRIGUES-AMAYA, 1997 e ANDRADE, 2003). Eles apresentam respectivamente três e cinco insaturações conjugadas (Figura 1.6) e estão presentes na batata baroa ou mandioquinha (Figura 1.7), o que justifica sua “cor”.

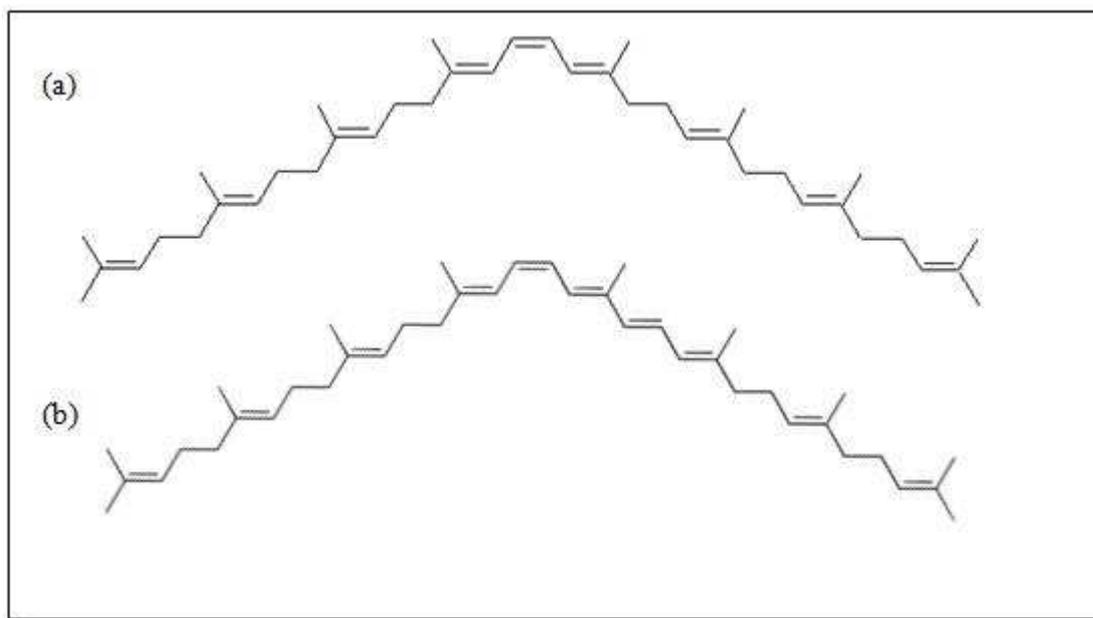


Figura 1.6. Estrutura química: (a) Fitoeno(C3) e (b) Fitoflueno (C5).



Figura 1.7 Batata-baroa. (PAPAVERO, 2006)

Quando o sistema conjugado é estendido, haverá um deslocamento para maior comprimento de onda no espectro de absorção da molécula (FRANCIS, 1986).

Como a cadeia poliênica pode ter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas (UENOJO *et al.*, 2007), então haverá uma faixa de absorção desde o ultravioleta (C3 à C6) (VILLELA, 1976), até a região do visível (maior que C7), (FONTANA *et al.*, 2000).

1.3.4 Isomerização e oxidação

Os isômeros *cis* são menos estáveis termodinamicamente que a forma *trans*. Portanto, a maior parte dos carotenóides ocorrem predominantemente na natureza na forma *trans* (BRITTON, 1995).

As condições que conduzem a algum tipo de alteração nos carotenóides, geralmente são promovidas por agentes como calor, pHs (<3 ou >7)(RIBEIRO & SERAVALLI, 2004), luz e oxigênio. Alguns desses fatores irão resultar na formação de isômeros *cis*, descoloração, ou mesmo em produtos de degradação, como os epóxidos (Figura 1.8), e a quebra da cadeia com formação de apocarotenoides (carotenóides com menos de 40 átomos de carbono) (COSTA *et al.*, 2002; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Em função de sua estrutura insaturada e conjugada os carotenóides estarão sempre sujeitos a modificações químicas e ou físicas. Assim a cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis é também causa da sua instabilidade, ou seja, susceptibilidade à isomerização e ou oxidação.

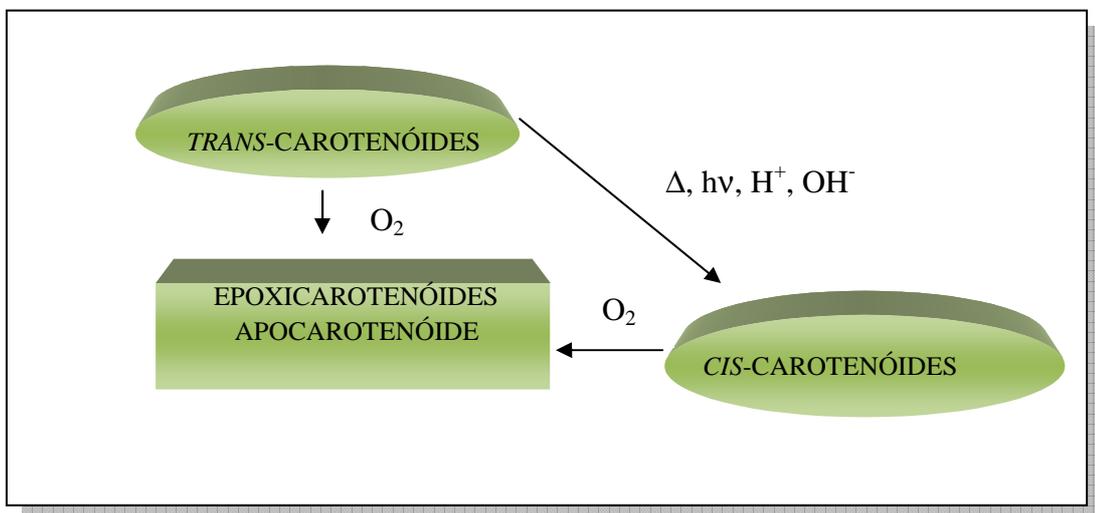


Figura 1.8. Esquema demonstrativo da degradação de carotenóides (RODRIGUES-AMAYA, 2002 modificado).

1.3.5 Aplicações dos carotenóides

O mercado de carotenóide é amplo e promissor, levando em consideração apenas os utilizados como corantes alimentares e suplementos nutricionais representam uma média de 100 milhões de toneladas por ano, com um faturamento global estimado em R\$ 935 milhões em 2005 (FRASER e BRAMLEY, 2004). Recentemente o setor que tem mais contribuído para o desenvolvimento da indústria e alimentos é o setor de enzimas, cujo mercado mundial apresenta valor comercial superior a um bilhão de dólares anuais. Elas constituem o grupo mais importante de metabólitos microbiano e de diversificada utilização na indústria de alimentos.

Durante os últimos anos, tem existido um interesse considerável em carotenóides dietéticos, principalmente pelo seu potencial em aliviar doenças relacionadas com a idade (FRASER e BRAMLEY, 2004). Outras atividades biológicas têm sido atribuídas mais recentemente aos carotenóides. Uma destacável é a sua função bem conhecida como precursor de vitamina A, fato que confere aos carotenóides o status de estar entre os fitoquímicos mais bem citados como responsável pela redução do desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular (perda da visão no centro do campo visual), fortalecimento imunológico e proteção contra queimaduras solares (VELU *et al.* 2003 e AZEVEDO-MELEIRO, 2004). A Tabela 2 resume as principais ações biológicas e físico-químicas dos carotenóides.

Tabela 2. Ações biológicas e propriedades físicas e químicas dos carotenóides. (RODRIGUES-AMAYA, 2001).

AÇÃO BIOLÓGICA		FÍSICO-QUÍMICAS
Estabilidade genômica	CAROTENÓIDES	Seqüestra oxigênio singlete
Induzem apoptose células T-citotóxicas		Absorve Luz
Diminuição do risco de câncer		Captura radicais livres
Atividade pró-vitamina A		Lipofílicos insolúveis em água
Prevenção de doenças cardiovasculares		Liga a superfícies hidrofóbicas
Diminui efeitos adversos (altas doses) fumantes		Facilmente isomerizado

1.4 Complexos de inclusão com carotenóides

Atualmente, estudos estão sendo desenvolvidos na tentativa de proteger carotenóides de fatores ambientais. Utilização de antioxidantes naturais (PSZCZOLA, 1998) ou algum tipo de suspensão são bem interessantes, mas o mais desejável é o processo de encapsulação, por torná-los dispersíveis em água.

A microencapsulação é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais como luz, ar e umidade. Várias técnicas e agentes encapsulantes vêm sendo sugeridos, (RÉ, 1998 e SHAHIDI, 1993) e na última década houve um grande progresso no desenvolvimento de ingredientes microencapsulados (JACKSON, 1991 e POPPLEWELL, *et al.* 1995). Os estudos encontram-se avançados em relação ao aroma, mas ainda limitados em termos de corantes.

Dentre os encapsulantes, as ciclodextrinas (CD's) são substâncias obtidas a partir da degradação enzimática do amido (VILLERS, 1991) e são muito adequadas para microencapsulação por inclusão molecular. São oligossacarídeos cíclicos formados por um número variável de unidades de glicose, unidas entre si por ligações α -(1,4) (Figura 1.9a). As CD's mais conhecidas são a α , β , e γ -ciclodextrina, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam a conformação de cadeira. Do ponto de vista estrutural, as CD's apresentam-se na forma de “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6 (Figura 1.9b). A dimensão da cavidade da CD (Tabela 3) é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CD's (Figura 1.9b), enquanto as hidroxilas livres na parte externa das CD's conferem a essas moléculas um caráter hidrofílico. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CD's possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de complexos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a “dissolução” em meio aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas em diferentes áreas da ciência e tecnologia, sendo o principal domínio de aplicação a indústria farmacêutica ,

em função da possibilidade de obtenção de novos fármacos com propriedades físicas e químicas diferentes e o mesmo princípio ativo.

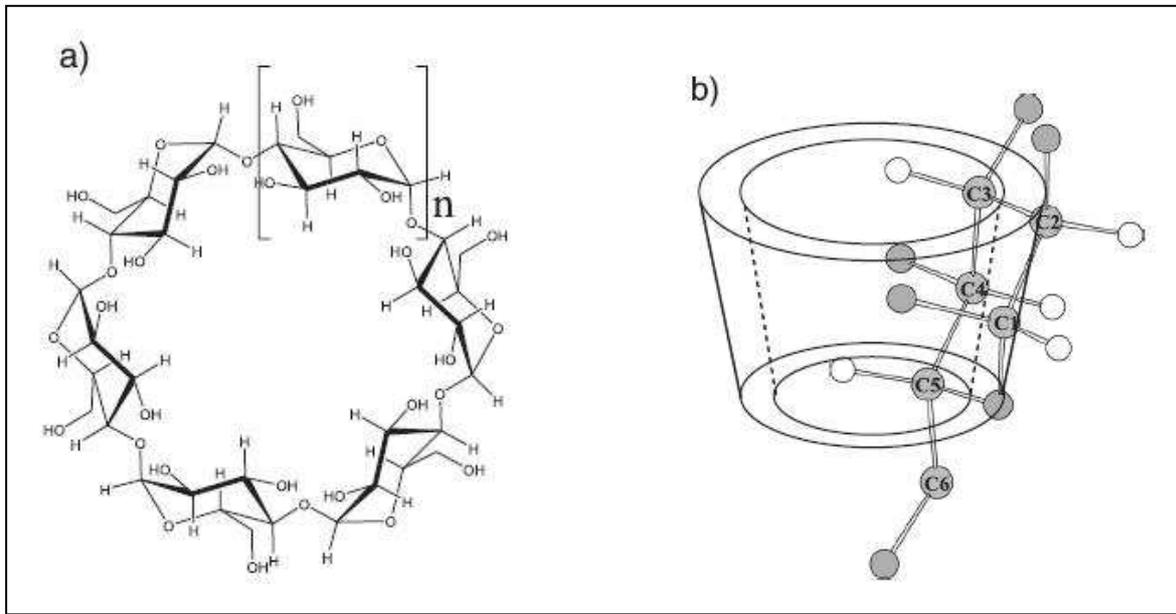


Figura 1.9 (a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD's). Os derivados α , β , e γ -CD são definidos por $n=1, 2$ e 3 , respectivamente. (b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's, mostrando as características definidas pelo arranjo das unidades de glicose (BRITTO *et al.*, 2004)

As CD's atuam como sistemas carregadores de fármacos, pois aumentam a solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade da molécula hóspede e diminuem a toxicidade e o seu efeito quando se trata de uma droga, dentre outros fatores (HAIYUN *et al.*, 2003), o que justifica sua aplicação em inúmeras áreas (DEL VALLE, 2004).

Tabela 3. Dimensões das CD's (SZEJLI, 1998).

Propriedade	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades glucopiranoses	6	7	8
Diâmetro externo (Å)	14.6	15.4	17.5
Diâmetro interno (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura da cavidade (Å)	7.9	7.9	7.9
Volume aproximado da cavidade (Å) ³	174	262	427

Como o número de unidades glucopiranoses varia entre estas CD's nota-se uma variação do peso molecular, diâmetros interno e externo e volume. A única propriedade que não sofre alteração é a altura da cavidade. Baseado nessas dimensões, geralmente, a

α -CD complexa com moléculas de baixo peso molecular, a β -CD forma complexos de inclusão com compostos aromáticos, heterocíclicos e alifáticos e a γ -CD, com moléculas maiores, como macrociclos e esteróides (DEL VALLE, 2004).

As Figuras 1.10 e 1.11 exemplificam, respectivamente, como pode ocorrer um processo de inclusão de um fármaco qualquer e como podem ocorrer as interações moleculares no interior da cavidade hidrofóbica.

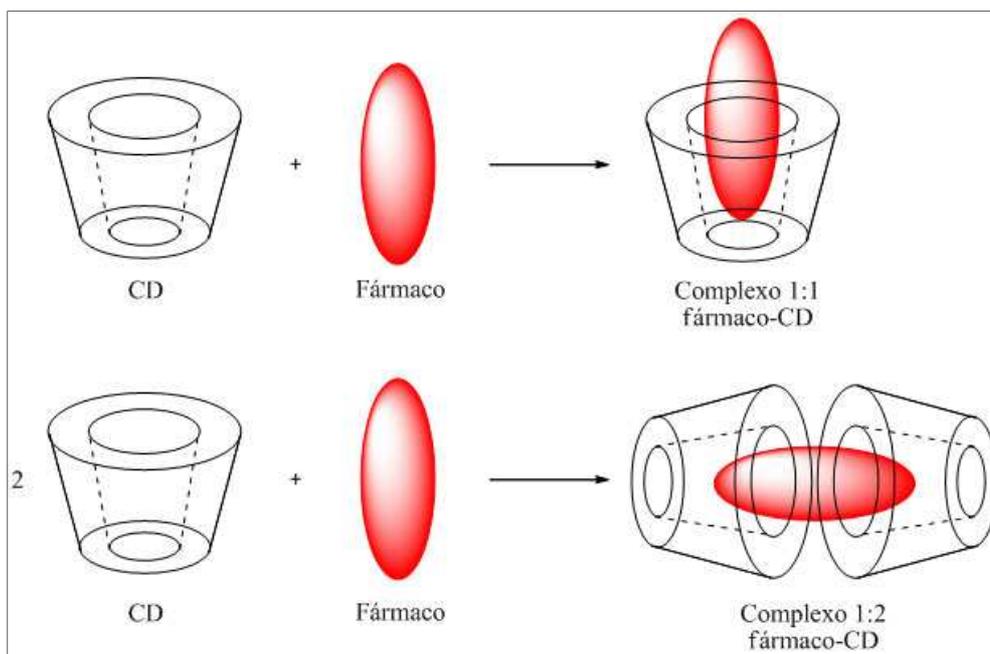


Figura 1.10. Exemplo de um processo de inclusão fármaco-CD em diferentes estequiometrias (NICOLLAZZI *et al.*, 2001)

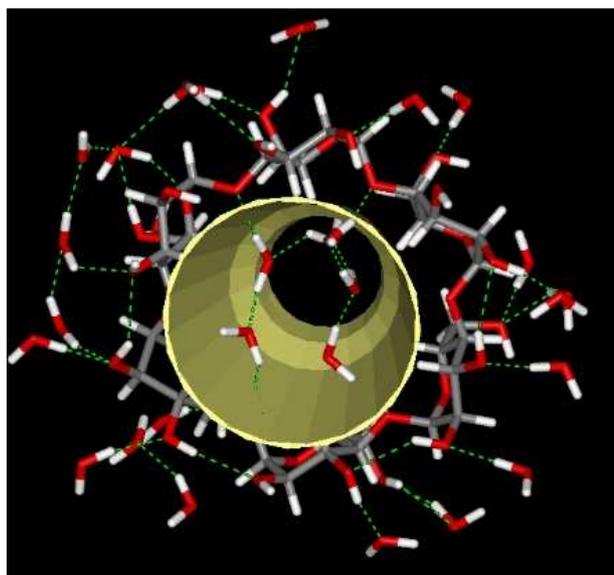


Figura 1.11. Interações intermoleculares na cavidade da β - CD (NICOLLAZZI *et al.*, 2001)

1.5 Objetivos

Esta dissertação apresenta como objetivo principal desenvolver o estudo vibracional de carotenóides presentes em amostras naturais e em sistemas sintéticos contendo oligossacarídeos. Assim este trabalho está dividido em duas etapas:

Primeiramente uma série de carotenóides de ocorrência natural (frutos, folhas, legumes) juntamente com seus respectivos padrões foram devidamente estudados. As análises consistiram em medidas do tecido vegetal, através da espectroscopia Raman com posterior comparação com seu extrato padrão. Um monitoramento das bandas principais dos carotenóides foi realizado e um total de oitenta amostras analisadas, sendo apenas 43 sistematicamente caracterizadas.

Um sistema sintético contendo a β -ciclodextrina e alguns carotenóides padrões foram desenvolvidos. Através deste sistema, complexos de inclusão foram preparados a fim de se investigar o comportamento vibracional das principais bandas de um carotenóide quando este é microencapsulado. Portanto verificar como uma matriz pode influenciar, ou não, o ambiente químico no qual moléculas de carotenóides estão inseridas.

Portanto a principal motivação deste trabalho resume-se em encontrar uma relação entre modos vibracionais $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ e $\nu_2(\text{C}-\text{C})$ (BARNARD, 2005) de padrões isolados com amostras reais, e obter um sistema onde diferentes carotenos possam interagir com oligossacarídeos e identificar ou não desvios de valores de número de onda.

2 Fundamentos de Espectroscopia Raman

2.1 Aspectos Teóricos

2.1.1 Espectroscopia Vibracional – Aspectos Gerais

A espectroscopia vibracional investiga transições (vibrorotacionais em fase gasosa) com o objetivo de obter informações a respeito da geometria molecular (através do número de modos vibracionais ativos nos espectros Raman e infravermelho), bem como da natureza das ligações químicas presentes na molécula (valores das frequências vibracionais ou mais propriamente das constantes de força) (SALA, 2008).

As principais técnicas utilizadas são a espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), a espectroscopia Raman (espalhamento Raman), e numa extensão muito menor, a espectroscopia de espalhamento de nêutrons. A seguir consideraremos os fundamentos teóricos mais relevantes envolvidos na espectroscopia Raman, exclusivamente utilizada neste trabalho.

2.1.2 O efeito Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica que consiste como característica principal o espalhamento inelástico de luz pela matéria quando irradiada por luz monocromática. Neste processo, fótons incidentes sofrem espalhamento por moléculas e trocam com as mesmas uma determinada quantidade de energia vibracional. Este fenômeno foi previsto teoricamente por Smekal em 1923 e verificado experimentalmente pelos físicos indianos Chandrasekhara Venkata Raman e K.S. Krishnan em 1928, tendo recebido o Prêmio Nobel de Física em 1932 por este feito. A partir deste momento iniciou-se a espectroscopia Raman (SALA, 2008)

Um espectro Raman nos mostra, da mesma maneira que um espectro IV, um conjunto de transições vibracionais da molécula, e o fato dos dois espectros, em geral, não serem idênticos (COLTHUP, 1990 E BERTOLUTI, 1978), reflete a existência de diferentes regras de seleção, o que fica mais óbvio no caso de moléculas com maior simetria.

No caso da espectroscopia Raman, além da regra de seleção geral $\Delta v = \pm 1$ válida dentro da aproximação harmônica, devemos considerar a regra de seleção específica:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0 \quad (1)$$

Uma diferença essencial entre as espectroscopias IV, eletrônica e Raman é que enquanto as duas primeiras envolvem a absorção ressonante de fótons ($h\nu = E_2 - E_1$), na última está envolvido o fenômeno de espalhamento inelástico de fótons. Neste caso devemos considerar a participação de dois fótons sendo que a conservação de energia vai implicar que a diferença de energia entre ambos (fóton incidente e fóton espalhado) deva ser igual à diferença de energia entre dois auto-estados moleculares. Portanto a energia do fóton incidente e do fóton espalhado, individualmente, não corresponde à diferença de energia entre quaisquer auto-estados da molécula. O caso que nos interessa aqui é aquele em que as transições em questão são transições vibracionais, mas tais transições podem ser também entre estados rotacionais, eletrônicos, de spin, etc. Podemos então representar uma transição vibracional Raman de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.1.

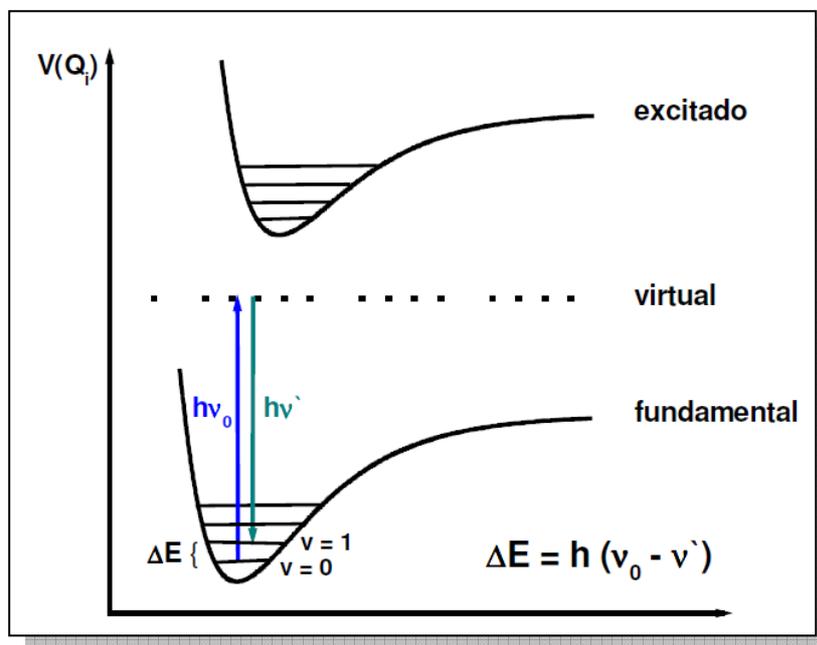


Figura 2.1. Transição vibracional (Raman).

É importante notar que o fóton incidente ($h\nu_0$) e o fóton espalhado ($h\nu'$) não devem ser considerados separadamente, pois o espalhamento não pode ser considerado como um

processo sequencial de absorção e emissão, que é o caso da fluorescência. A escala de tempo envolvida no espalhamento Raman é da ordem de femtosegundos (10^{-15} s), e por isso implica que pela relação de incerteza $\Delta E \cdot \Delta t \geq \hbar$, a energia do chamado estado virtual (ou intermediário) não precisa satisfazer o princípio da conservação de energia. Esse estado recebe este nome exatamente por essa razão, ou seja, não corresponde a nenhum dos estados estacionários da molécula, na verdade o estado virtual é um autoestado do sistema molécula + radiação. Neste ponto é importante chamar a atenção para a contribuição central da polarizabilidade eletrônica do efeito Raman.

2.1.3 - Polarizabilidade eletrônica molecular

O efeito Raman envolve a interação do campo elétrico da radiação eletromagnética com a distribuição da nuvem eletrônica molecular, pois usualmente a radiação monocromática utilizada está na região do visível, ultravioleta ou infravermelho próximo, o que corresponde a frequências relativamente altas, condição na qual apenas os elétrons respondem à excitação. A resposta dos elétrons se manifesta através da polarizabilidade eletrônica, (α). De fato, o campo elétrico oscilante induz na molécula um momento de dipolo, (P), que passa a ter uma relação de proporcionalidade com o vetor campo elétrico (Equação 2). Esse momento de dipolo pode ser decomposto num componente que oscila com a mesma frequência do campo elétrico e em outros componentes cujas frequências são moduladas pelas frequências vibracionais da molécula.

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (2)$$

Em geral, quando se analisa a expressão em relação aos eixos cartesianos x, y e z observa-se que nem todos os vetores \vec{P} e \vec{E} são paralelos, fazendo com que α atue como um tensor:

$$\begin{aligned} \vec{P}_x &= \alpha_{xx} \vec{E}_x + \alpha_{xy} \vec{E}_y + \alpha_{xz} \vec{E}_z \\ \vec{P}_y &= \alpha_{yx} \vec{E}_x + \alpha_{yy} \vec{E}_y + \alpha_{yz} \vec{E}_z \\ \vec{P}_z &= \alpha_{zx} \vec{E}_x + \alpha_{zy} \vec{E}_y + \alpha_{zz} \vec{E}_z \end{aligned} \quad (3)$$

Estes tensores apresentam a propriedade de possuir certa simetria no efeito Raman, isto é $\alpha_{xy}=\alpha_{yx}$; $\alpha_{xz}=\alpha_{zx}$; $\alpha_{yz}=\alpha_{zy}$.

Para que seja observado o efeito Raman, o fenômeno de transição entre dois números quânticos vibracionais m e n é necessário considerar cada componente referente à polarizabilidade (α). Assim, para haver atividade no Raman é necessário que pelo menos uma das componentes das seis integrais:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (4)$$

seja diferente de zero. (* i e j podem ser x , y ou z)

Considerando que a polarizabilidade (equação 4) pode ser escrita em série da coordenada interna q (única coordenada normal do sistema em estudo) em primeira ordem como (Sala, 2008):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right) q + \dots \quad (5)$$

Na equação (5) α é o tensor polarizabilidade referente aos eixos x , y e z , α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e q é a coordenada interna. Efetuando uma substituição trivial da expressão (5) em (4) temos:

$$\alpha = \alpha_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau + \dots \quad (6)$$

Para que seja observado espalhamento no efeito Raman é necessário que pelo menos uma integral da expressão (6) seja diferente de zero. Podemos perceber que na primeira integral o seu valor é igual a zero, devido à ortogonalidade das funções de onda ψ_m e ψ_n . Para que a segunda integral seja diferente de zero é necessário satisfazer algumas condições:

- $(\partial\alpha/\partial q)_0 \neq 0$, é necessário que ocorra uma variação da polarizabilidade com o deslocamento da coordenada normal q em torno da posição de equilíbrio;
- $\int \psi_m q \psi_n d\tau$, para que esta integral seja diferente de zero é necessário que o produto $\psi_m q \psi_n$ seja uma função par. Como q é uma função ímpar, é necessário que o produto $\psi_m \psi_n$ seja uma função ímpar, isto faz com que haja a necessidade de que as duas funções de onda apresentem diferentes paridades. Assim aparece uma importante regra de seleção para a espectroscopia Raman :

$$\Delta v = \pm 1 \quad (7)$$

Podemos considerar a polarizabilidade como uma medida da facilidade de deformação da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico, e assim sendo devemos esperar valores elevados de α para moléculas contendo átomos pesados (grande número de elétrons e baixo potencial de ionização), envolvendo ligações químicas covalentes pouco polarizadas. Se levarmos em conta as vibrações moleculares, os movimentos nucleares irão induzir flutuações na polarizabilidade com frequências que correspondem aos vários modos normais de vibração. Em outras palavras, na presença de radiação eletromagnética, a polarizabilidade terá o seu valor modulado pela frequência da radiação, bem como pelas frequências das vibrações moleculares. Teremos então uma situação conhecida no âmbito da física ondulatória como um fenômeno de “batimento”. Considerando-se uma molécula diatômica teremos três componentes do momento de dipolo induzido, com dependência temporal que varia com ν_0 , $\nu_0 + \nu_v$ e $\nu_0 - \nu_v$ onde ν_v corresponde a uma das $3N-6$ frequências vibracionais da molécula (SALA, 2008):

$$\bar{P} = \alpha_0 \bar{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \bar{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \quad (8)$$

(I)
(II)
(III)

O primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico). No segundo e terceiro

termos aparecem radiações com frequência $\nu_0 + \nu_v$ (espalhamento anti-stokes) e $\nu_0 - \nu_v$ (espalhamento Stokes). Para os dois últimos termos apresentarem contribuição significativa é necessário que $(\partial\alpha/\partial q)_0 \neq 0$, ou seja, que haja uma variação infinitesimal da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada (q) em torno da posição de equilíbrio. O espalhamento elástico (Rayleigh) e os espalhamentos inelásticos (anti-stokes e Stokes) podem ser esquematicamente representados como mostra a Figura 2.2.

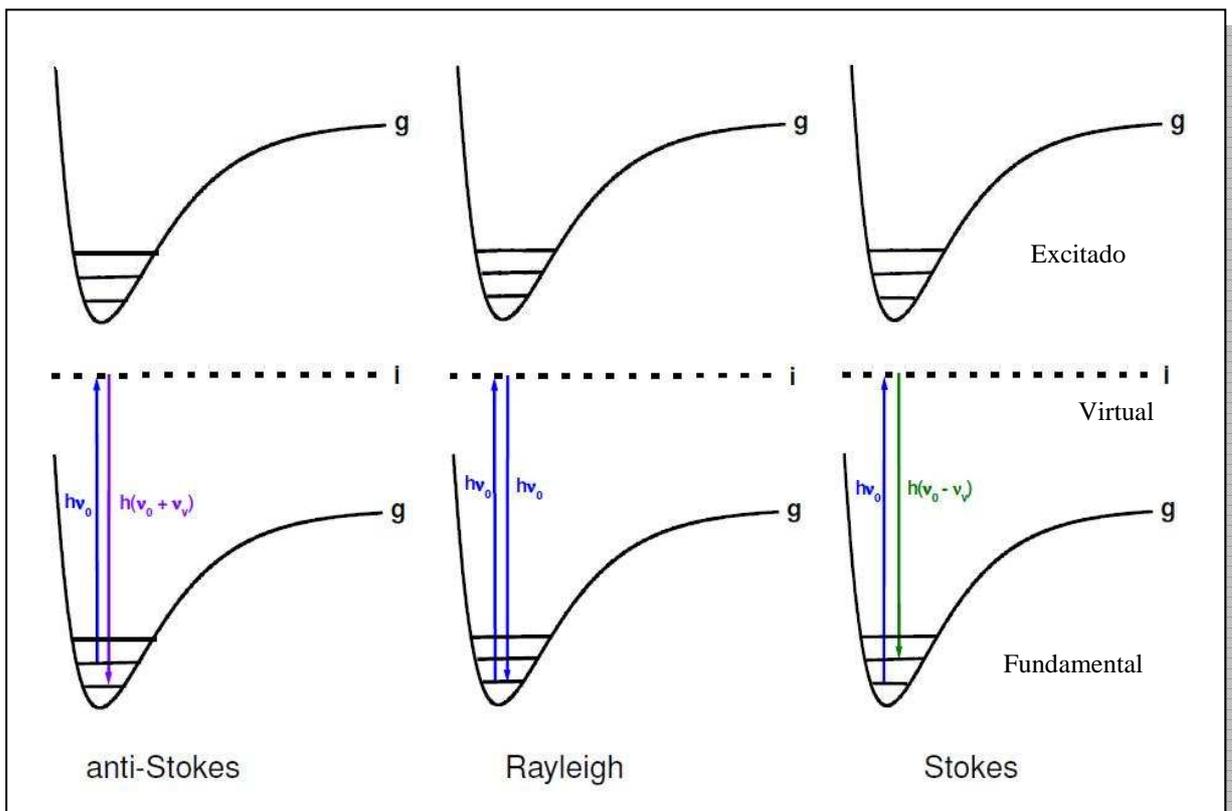


Figura 2.2. Espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes)

2.1.4 - Aproximação de Placzek

Como visto anteriormente a transição Raman envolve, além dos estados vibracionais inicial e final, um conjunto de estado virtuais cujas energias não tem qualquer valor limite. Isto em princípio representaria uma grande dificuldade para o cálculo teórico da intensidade Raman, uma vez que para tal cálculo precisaríamos

inicialmente expressar a contribuição de infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica. No tratamento magistral do efeito Raman publicado em 1934, G. Placzek (PLACZEK, 1934) introduz uma aproximação que permite reduzir esse complicado problema a um muito mais simples, que envolve apenas polarizabilidade do estado eletrônico fundamental. Esta aproximação passou a ser conhecida como aproximação de Placzek ou teoria da polarizabilidade do efeito Raman. Dentre as diversas condições implícitas para a validade dessa aproximação devemos destacar aqui aquela que impõe que a energia do fóton de excitação seja muito menor do que a energia correspondente à energia da transição eletrônica mais baixa da molécula. Para satisfazer esta imposição utilizam-se lasers de excitação tendendo para a região do infravermelho. Tal condição pode ser exemplificada utilizando uma excitação no visível, por exemplo $\lambda_0 = 500 \text{ nm}$ (20000 cm^{-1}), para obter o espectro Raman de uma molécula como o benzeno, em que a transição de menor energia é da ordem de 200 nm (50000 cm^{-1}) (NAKAMOTO, 1994). Situações desse tipo correspondem ao assim chamado efeito Raman ordinário ou efeito Raman normal, denominação utilizada para diferenciá-lo do efeito Raman ressonante ou pré-ressonante (CLARK, 1991 e ALBRECHT, 1970). Nesses últimos casos a energia do fóton de excitação é comparável ou mesmo coincidente com a energia de transição eletrônica, o que invalida a aproximação de Placzek.

Uma transição Raman entre dois estados inicial (i) e final (f) em um sistema espalhador, a intensidade (I_{fi}) da luz espalhada pode ser expressa pela expressão:

$$I_{fi} \propto \frac{\pi^2}{\epsilon_0^2} (\nu_0 \pm \nu_{fi})^4 E_0 [\alpha]_{fi} [\alpha]_{fi}^* \quad (9)$$

onde E_0 é a amplitude do campo elétrico da radiação incidente, ν_0 e ν_{fi} , são números de onda da radiação de excitação e da transição Raman final inicial respectivamente, ϵ_0 é a permissividade do espaço livre e $[\alpha]_{fi}$ é o momento polarizabilidade de transição. A expressão para $[\alpha]_{fi}$ é obtida através da teoria de perturbação de segunda ordem, e é conhecida como equação de dispersão de Kramers-Heisenberg-Dirac, (Oliveira, 1991) podendo ser expressa da seguinte maneira:

$$[\alpha]_{fi} = \frac{1}{hc} \sum_r \frac{[\alpha]_{fr} [\alpha]_{ri}}{\nu_{ri} - \nu_0 + i\sqrt{r}} + \frac{[\alpha]_{fr} [\alpha]_{ri}}{\nu_{rf} + \nu_0 + i\sqrt{r}} \quad (10)$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz, ν_{ri} a frequência de uma transição eletrônica e $i\sqrt{r}$ é o fator de amortecimento, que foi introduzido por Dirac para prevenir que a expressão se tornasse infinita quando ν_{ri} se aproximasse ou se igualasse a ν_0 . A expressão (10) representa a base para a compreensão do efeito Raman normal (ou ordinário) e também do ressonante.

Quando se utiliza uma radiação eletromagnética ν_0 próxima de uma transição eletrônica ν_{ri} ocorre uma intensificação do tensor polarizabilidade de transição e conseqüentemente através da expressão (9) ocorre um aumento da intensidade, descrevendo o chamado efeito Raman ressonante, no qual esta intensificação é seletiva e não apresenta a mesma intensificação para todas as bandas, podendo este ganho de intensidade chegar a cinco ordens de grandeza (MILLEN *et al.*, 2005). Entretanto, como o efeito de espalhamento ocorre de maneira muito pouco efetiva, 1 em cada 10^7 fótons é espalhado inelasticamente; esta forma de medida não é indicada para amostras que apresentam fluorescência, devido ao fato de competir com o fóton espalhado. No espalhamento Raman normal utiliza-se uma radiação eletromagnética que apresenta uma frequência que possui energia distante de uma transição eletrônica permitida, por exemplo, lasers na região do infravermelho, obtendo-se desta forma modos vibracionais menos intensificados, mas garantindo que efeitos como fluorescência, que podem prejudicar a medida sejam minimizados ou até mesmo eliminados.

A espectroscopia Raman apresenta uma série de vantagens perante outras técnicas, como não ser destrutiva e não requerer preparo de amostra, cobertura especial e atmosfera controlada. A análise não causa como regra, danos ou alterações e é possível efetuar investigações posteriores com outras técnicas na mesma amostra. Além disto, a instrumentação permite análises em uma região espectral que pode ser expandida até 50 cm^{-1} ou menos, sem a utilização de suportes.

Enfim, é uma técnica muito versátil para o estudo de inúmeros sistemas químicos, e neste caso, carotenóides, uma vez que estes sistemas são muito insaturados e a presença de elétrons π numa ligação química tende a aumentar consideravelmente a polarizabilidade da ligação.

3 Experimental

3.1 Amostragem

3.1.1 Amostras naturais

Dentre as amostras analisadas, foram investigados tecidos vegetais, frutos, cascas e algumas especiarias (Tabela 4). Todas elas foram adquiridas em mercados locais de Juiz de Fora, com exceção dos padrões que foram comprados através da Sigma-Aldrich Co. (β -caroteno sintético tipo II, pureza $\geq 95\%$, licopeno do tomate $\geq 90\%$, astaxantina $\geq 92\%$, β -criptoxantina, zeaxantina $\geq 95\%$ e xantofila $\sim 90\%$ (HPLC).

No geral, foram utilizados doze padrões (Tabela 5), sendo que seis, como mencionado anteriormente, foram comercializados e os demais obtidos a partir da literatura (RODRIGUES-AMAYA, 2001).

Tabela 4. Amostras e seus respectivos nomes científicos.

AMOSTRAS	
Açafrão da terra (<i>Crocus sativus L.</i>)	Urucum (<i>Bixa orellana L.</i>)
Abóbora (polpa) (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
Alface manteiga (<i>Lactuca Sativa Capitata</i>)	Erva Cidreira (<i>Melissa Officinalis</i>)
Batata doce (<i>Ipomea batatas</i>)	Chá verde (<i>Camellia Sinensis</i>)
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	Mamão (<i>Carica papaya</i>)
Cenoura (<i>Daucus Carota</i>)	Manga (<i>Mangífera</i>)
Mexerica (<i>Prunus perica L. var. nucipersica</i>)	Pêssego (<i>Prunus pérsica</i>)
Laranja (<i>Citrus aurantium</i>)	Pimentão (<i>Capsicum annum L.</i>)
Limão (<i>Citros X Limon</i>)	Páprica picante (<i>Capsicum annum L.</i>)
Acafrão amarelo (<i>Crocus sativus L.</i>)	Colorífico (<i>Bixa orellana L.</i>)
Brocolis (<i>Brassica oleracea</i>)	Nectarina (<i>Prunus perica L.</i>)
Damasco	Nos moscada

(<i>Prunus armeniaca</i> L.)	(<i>Myristica bicuhyda</i> schoot)
Repolho	Polpa de pequi
(<i>Brassica oleracea</i>)	(<i>Caryocar vilosum</i>)
Pimenta vermelha	Cebola roxa
(<i>Capsicum annum</i> L.)	(<i>Allium cepa</i> L.)
Casca de pequi	Pimenta verde
(<i>Caryocar vilosum</i>)	(<i>Capsicum annum</i> L.)
Milho	Polpa de maracujá
(<i>Zea mays</i>)	(<i>Passiflora edulis flavicarpa</i>)
Farinha de milho	Alho
(<i>Zea diploperennis</i>)	(<i>Allium sativum</i>)
Espinafre	Camomila
(<i>Spinacia oleracea</i> L.)	(<i>Matricaria chamomilla</i>)
Polpa de banana	Canela da china
(<i>Musa spp</i>)	(<i>Cinnamomum cássia</i>)
Guaraná (pó)	Ameixa seca
(<i>Paullinia cupana</i>)	(<i>Prunus armeniaca</i>)
Polpa de morango	Semente de linhaça
(<i>Fragaria vesca</i>)	(<i>Linum usitatissimun</i>)
Casca de pêra	
(<i>Pyrus communis</i>)	

(Papavero, 2006)

As espécies foram escolhidas de modo a apresentarem uma boa textura e qualidade. Assim, todas foram compradas no mesmo dia em que as análises foram feitas, evitando assim algum tipo de dano, por exemplo, apodrecimento.

Esses cuidados foram necessários, pois as análises foram feitas diretamente sobre as mesmas, sem a utilização de nenhum tratamento prévio, portanto a boa qualidade das espécies foi levada em consideração.

Tabela 5. Carotenóides padrões.

Carotenos Padrões	
Xantofila	Luteína
Zeaxantina	α -caroteno
β -caroteno	Crocetina
Licopeno	Capsantina
β -Criptoxantina	<i>Cis</i> -bixina
Astaxantina	<i>Trans</i> -bixina

3.1.2 Ciclodextrina

A β -ciclodextrina (Figura 3.1), oligossacarídeo utilizado neste trabalho, foi adquirido da Sigma Aldrich e usada sem nenhum tratamento prévio.

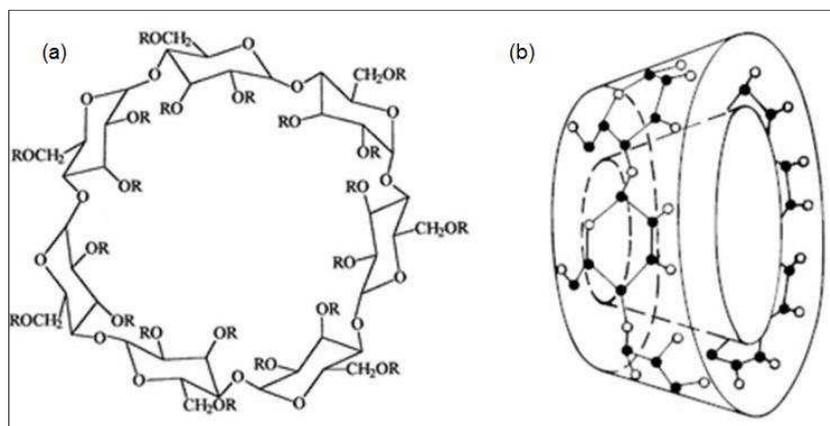


Figura 3.1. Representação da estrutura da β -ciclodextrina: a) no plano b) tronco-cônica (BRITTO *et al.*, 2004 modificado)

A β -ciclodextrina é um tipo de pó cristalino branco (Figura 3.2), inodoro e apresenta como fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_7$ e peso molecular de 1135 g/mol.



Figura 3.2. Amostra da β -CD comercializada da Sigma-Aldrich.

3.2 Procedimentos e instrumentação

3.2.1 Amostras naturais

Alguns requisitos foram necessários para desenvolver as análises, uma vez que os carotenóides apresentam-se instáveis em ambientes com muita luz e ou oxigênio. Desta forma, qualquer que fosse o método escolhido, medidas de precaução para evitar a formação de intermediários indesejáveis e perdas quantitativas, foram levadas em consideração como práticas padrões no laboratório. Isto inclui a combinação da realização rápida das análises, proteção contra luz, evitar temperaturas altas, utilizar solventes de alto grau de pureza e armazenar em temperaturas baixas e de preferência em atmosfera inerte.

A combinação oxigênio, luz e temperatura são altamente destrutivas. A presença de oxigênio ou de qualquer oxidante mesmo em extratos brutos de carotenóides pode gerar rapidamente um descoloramento e a formação de intermediários, tais como epoxicarotenóides e apocarotenóides. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

A exposição de carotenóides à luz, especialmente solar e luz ultravioleta incidindo diretamente, induz a um processo de fotoisomerização *cis-trans* e à fotodestruição de carotenóides. Portanto, todo procedimento experimental foi realizado em ambiente com pouca luz e os recipientes de armazenamento foram cobertos com papel laminado.

As medidas foram efetuadas pelo menos duas vezes em cada posição das amostras, uma maneira de demonstrar reprodutibilidade e assim garantir a consonância com a preservação da integridade da amostra.

3.2.2 Ciclodextrinas

3.2.2.1 Preparo dos complexos de inclusão

O processo reacional foi dividido em quatro etapas:

1- Um excesso de β -ciclodextrina hidratada (360 mg ou 0,32 mmol) foi dissolvida em 10 mL de água deionizada e uma solução incolor foi formada.

2- Nesta etapa foram utilizados quatro carotenóides (Figura 3.3). Para cada um, foram pesados 1mg e solubilizados em 2 mL de acetona.

3- Uma mistura entre a solução contendo a β -ciclodextrina (360 mg) e os respectivos carotenóides (1mg) foi realizada.

4- O sistema formado foi mantido em atmosfera de nitrogênio, proteção da luz e agitação, entre cinco e sete dias. O complexo resultante foi seco em alto vácuo e acondicionado adequadamente em um dissecador e ao abrigo da luz.

A Figura 3.4 representa um esquema resumido das etapas mencionadas anteriormente.

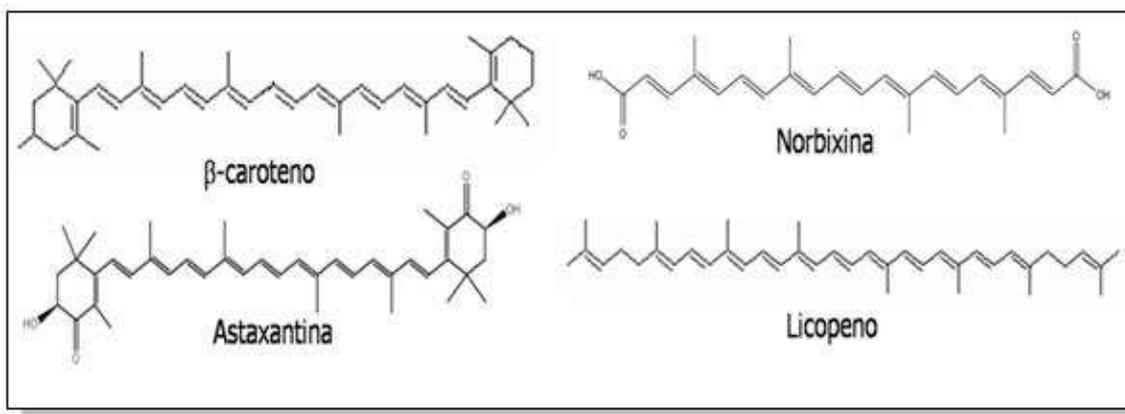


Figura 3.3. Estruturas dos carotenóides utilizados no processo de inclusão.

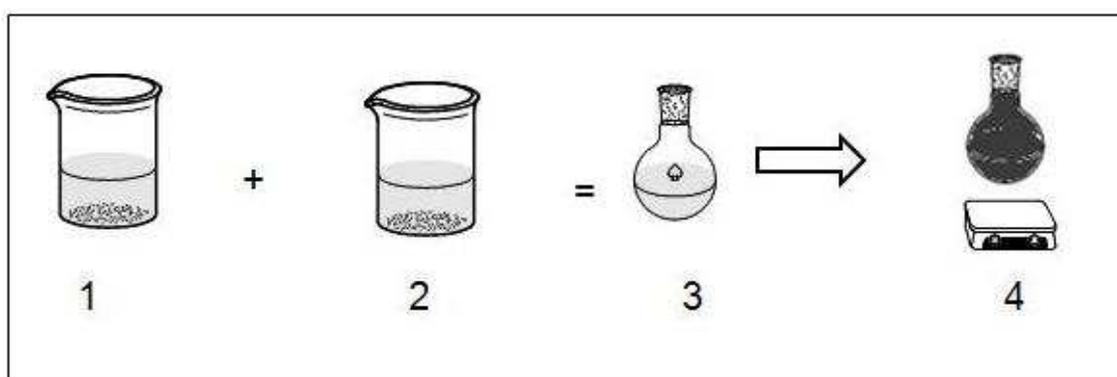


Figura 3.4. Representação esquemática do preparo dos complexos de inclusão.

Dentre os carotenóides utilizados no processo de inclusão, apenas a norbixina não foi comercializada. Como o padrão deste não está disponível no mercado, a obtenção foi feita a partir do isolamento de uma fonte natural do mesmo, o urucum.

O urucueiro (*Bixa orellana L.*) é uma planta nativa da América tropical (PRESTON, 1980). Suas sementes são cobertas por uma resina vermelha que contém como pigmento principal os carotenóides bixina e norbixina, sendo esta última um produto da saponificação da bixina.

3.2.2.2 Extração da Norbixina

Na literatura (PRENTICE-HERNANDES *et al.*, 1992 e TOCCHINI *et al.*, 2001) existem diferentes métodos para a extração deste carotenóide. Quando em escala comercial, três métodos básicos são usados para extrair o pigmento das sementes: a) extração alcalina, que resulta na conversão do carotenóide de uma forma de éster monometílico lipossolúvel a hidrossolúvel, ou seja, sal de norbixina; b) extração em óleo, que resulta na remoção da bixina das sementes além de pequenas quantidades de outras substâncias coloridas, e c) extração com solvente, que resulta na forma mais pura do pigmento bixina (PRENTICE-HERNANDES e RUSIG, 1992). Para este trabalho, utilizamos a extração com soluções alcalinas em meio ácido, uma vez que trata-se de um método simples, rápido e econômico.

Uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2% (NaOH) foi preparada e em seguida 3 g de sementes de urucum foram adicionadas na mesma. Por meia hora o sistema foi levado ao ultra som para extração dos pigmentos e formação do norbixinato. Para precipitar a norbixina, que é um ácido dicarboxílico insolúvel em água, o pH foi ajustado em 1,8 com ácido clorídrico concentrado (HCl). Após a precipitação e centrifugação do extrato de urucum, o pigmento foi lavado, filtrado e posteriormente acondicionado ao abrigo da luz (BHALKAR e DUBSH, 1983). A pureza do extrato (85%) foi verificada por cromatografia de camada delgada (CCD) e revelado em ultravioleta. A Figura 3.5 mostra as reações químicas envolvidas na extração do corante de urucum.

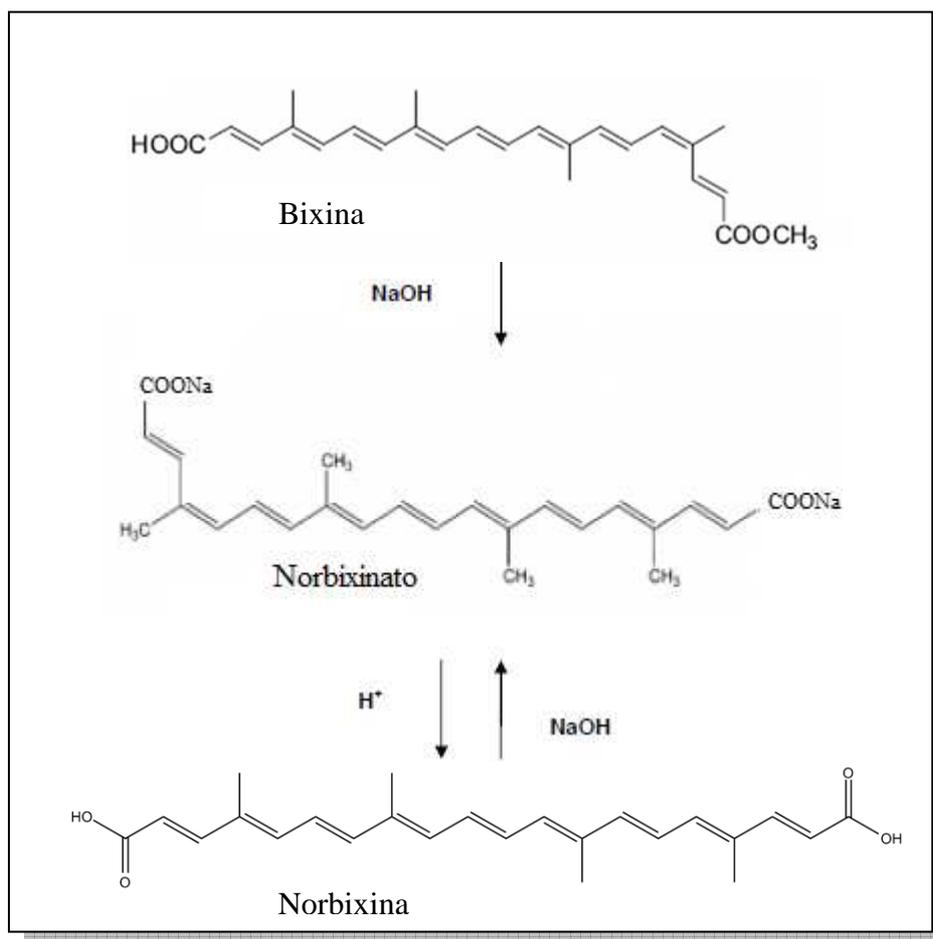


Figura 3.5. Reações para obtenção do carotenóide norbixina.

A reação mostra de forma clara que quando o meio é acidificado o norbixinato é reprotonado, dando origem à norbixina. Como este pigmento tem características apolares, ocorre a precipitação do mesmo.

3.2.3 Instrumentação

As análises espectroscópicas foram realizadas em um espectrômetro FT-Raman Bruker RFS 100 com um laser Nd⁺³/YAG operando com linha de excitação de 1064 nm na região do infravermelho próximo, dotado de um detector CCD e resfriado com nitrogênio líquido. O sistema macroscópico foi usado para obter todos os espectros; isto significa a utilização do laser numa área local de 0,5 milímetros da amostra.

Uma boa relação sinal/ruído para as medidas foi obtida a partir da realização de 3000 varreduras acumuladas por um período de aproximadamente 45 minutos. Foi utilizado uma resolução espectral de 3 cm⁻¹ para maioria das amostras e de 1 cm⁻¹ em alguns casos, como nas especiarias e nas cascas de frutas. Esta mudança de resolução foi necessária uma vez que algumas bandas não estavam bem ‘resolvidas’, portanto o aumento da resolução permite determinar as posições das destas de um modo mais seguro. Para evitar a degradação da amostra, foram utilizadas potências variadas, geralmente iniciando com valores menores e progressivamente aumentada para produzir uma melhoria da resposta espectral.

As análises para os complexos de inclusão foram executadas no mesmo equipamento e com as mesmas condições citadas anteriormente, exceto a resolução que foi de 3 cm⁻¹ para todos os complexos.

Os espectros foram analisados através do programa Grams/32 (6.00) e para a apresentação das figuras deste trabalho foi utilizado o programa Origin 7.0.

4 Resultados e discussões

4.1 Amostras Naturais

4.1.1 Carotenóides em tecidos vegetais

Em sistemas biológicos, carotenóides são encontrados em locais precisos (estruturas subcelulares) e suas propriedades físicas e químicas são fortemente influenciadas por outras moléculas nas suas mediações, principalmente proteínas celulose e lipídeos. Portanto apesar dos tecidos vegetais apresentarem diferentes tipo de substâncias, o que poderia mascarar a análise, os carotenóides presentes são bons espalhadores de luz (OLIVEIRA *et al*, 2009), justificando assim o uso as espectroscopia Raman no neste estudo.

Os tecidos vegetais investigados neste trabalho foram identificados taxonomicamente (Tabela 6) e caracterizados pela presença de carotenóides, uma vez que para cada espécie citada existe pelo menos um carotenóide predominante. Vale ressaltar que algumas dessas amostras não apresentaram nenhum estudo na literatura no que se refere a sua composição química. Na mesma Tabela 6, também são mostrados os números de onda das três principais bandas Raman (estiramento C=C; C-C e deformação C-CH₃ designados por ν_1 , ν_2 e ν_3 respectivamente). Estes modos já foram previamente relatados (BARNARD, 2005) e podem ser observados nas regiões situadas entre 1480 – 1580 cm⁻¹, 1100 – 1200 cm⁻¹ e 1000 – 1015 cm⁻¹ respectivamente. Os modos de vibração ν_1 e ν_2 são responsáveis pelas bandas mais intensas, consequência das vibrações de estiramento em fase ν_1 (C=C) e ν_2 (C-C) da cadeia poliênica (MERLLI, 1985). Já o modo de vibração ν_3 é responsável por uma banda de média a baixa intensidade, que contém uma contribuição do modo de deformação angular “rocking” dos grupos metilas ligados à cadeia poliênica. Existem ainda outras bandas de baixa intensidade e de menos relevância para este trabalho. Geralmente elas se situam na região entre 1280 e 1315 cm⁻¹ e são atribuídas a uma deformação no plano da ligação CH=CH da olefina.

A Figura 4 mostra o espectro Raman do β -caroteno (padrão), exemplificando os principais modos vibracionais citadas anteriormente e a região de deformação CH=CH* da olefina.

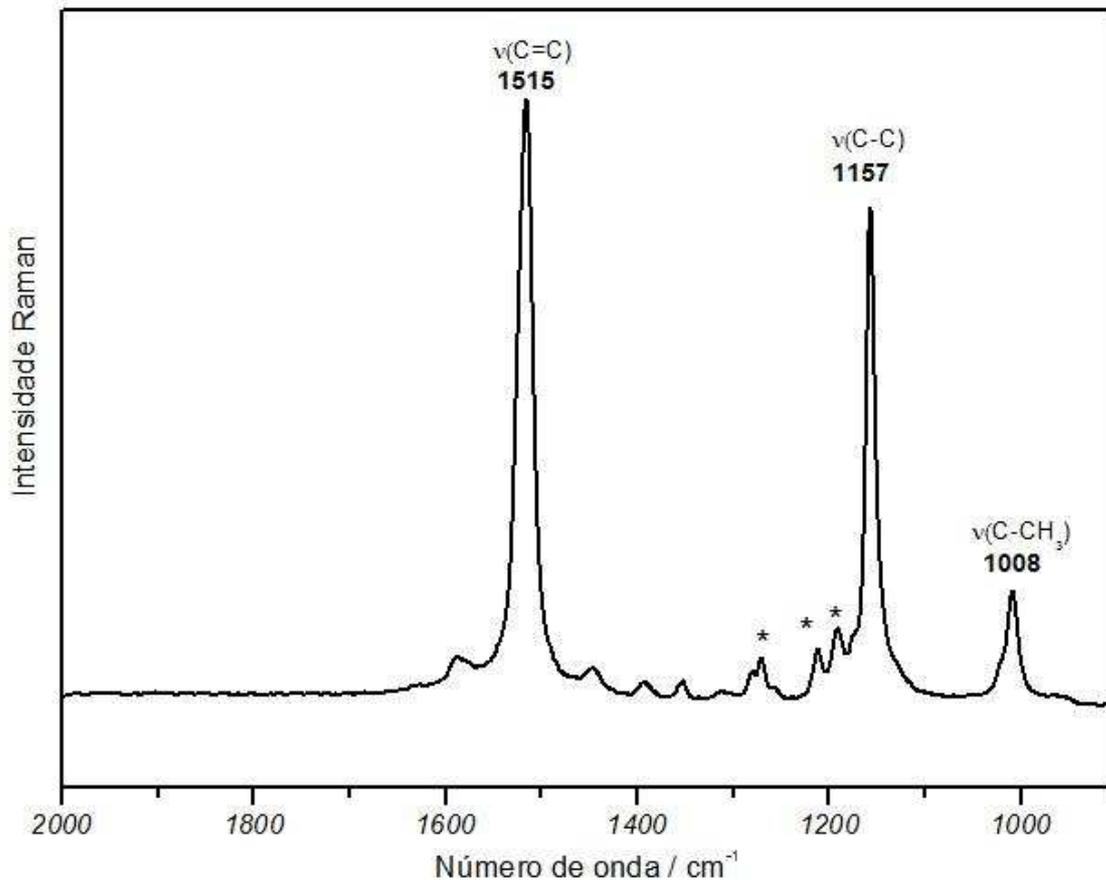


Figura 4. Espectro Raman do β -caroteno (padrão Sigma-Aldrich Co).

Vários fatores relacionados à estrutura podem influenciar a posição e as formas das bandas fundamentais dos carotenóides em diferentes graus. As bandas mais intensas estão principalmente associadas com o esqueleto da cadeia poliênica, e os fatores que determinam a posição dessas bandas são dependentes da natureza desta cadeia. De acordo com a literatura (KOYMA *et. al.*, 1983 e CLARK *et. al.*, 1991) os principais fatores que influenciam as posições dos modos principais são: fatores químicos de substituição e a química matriz/meio em que os carotenóides estão encontrados; conformação, isomerismo e fatores eletrônicos como o comprimento da conjugação da cadeia poliênica, que afeta o grau de deslocalização π .

Esses fatores são discutidos ao longo de todo o trabalho e justificados através dos resultados obtidos.

Tabela 6. Posição do número de onda dos modos ν_1 , ν_2 e ν_3 (em cm^{-1}) dos carotenóides predominantes obtidos a partir de amostras naturais por espectroscopia Raman.

	Amostra	Carotenoides predominantes	ν_1 (C=C)	ν_2 (C-C)	ν_3 (C-CH₃)
1	Açafrão (da Terra) (<i>Crocus sativus</i> L.)		1517	1166	1000
	Açafrão (Amarelo) (<i>Crocus sativus</i> L.)	Crocetina	1517	1155	1008
2	Brocolis (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> L.)	α -caroteno (0.03 mg/100 g), β -Caroteno (0.89 mg/100 g) e Luteína (34.6 $\mu\text{g/g}$)	1527	1156	1006
3	Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	Cis-Bixina (49,31 mg/g)	1519/1516	1154	1009
4	Colorífico [<i>Urucum</i> (<i>Bixa orellana</i> L.)]	Cis-bixina	1517	1155	1012
5	Nectarina (<i>Prunus perica</i> L. var. <i>ucipersica</i>)	β -caroteno (400-4000 $\mu\text{g/kg}$), β -criptoxantina (29-390 $\mu\text{g/kg}$)	1529	1157	1004
6	Cenoura (<i>Daucus Carota</i>), crua	β -caroteno (61.5 $\mu\text{g/g}$), α -caroteno (35 $\mu\text{g/g}$) e Luteína (5.1 $\mu\text{g/g}$)	1519	1156	1007
7	Nos Moscada (fruto) (<i>Myristica Bicuhyba</i> Schoot)	Capsantina, Capsorubina	1518	-	1003
8	Paprica picante (<i>Capsicum annum</i> L.)	Capsantina, Capsorubina	1521	1155	1007
9	Polpa de mamão (<i>Carica papaya</i>)	Licopeno (18.5- 23.9 $\mu\text{g/g}$), β -criptoxantina (8.2-11.7 $\mu\text{g/g}$) e β -caroteno (0.5-1.2 $\mu\text{g/g}$)	1525	1155	1008

10	Damasco (<i>Prunus armeniaca L.</i>)	β -Caroteno (>3000 $\mu\text{g}/100\text{g}$), ξ -caroteno (38 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Licopeno (~5 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	1526	1156 (sh)	1000
11	Alface manteiga (<i>Lactuca Sativa Capitata</i>)	β -Caroteno (13 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1525	1156	1004(w)
12	Repolho (<i>Brassica oleracea var. capitata.</i>)	β -Caroteno (0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1517	1158	1008
13	Pimenta vermelha (<i>Capsicum annum L.</i>)	β -Caroteno (3.8 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1527	1156	1006(w)
14	Polpa de abóbora (<i>Cucúrbita pepo L.</i>)	α -Caroteno 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$; 10-40 β -Caroteno	1527	1157	1008
15	Casca de abóbora (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	β -Caroteno (17 $\mu\text{g}/\text{g}$), Luteína (10 $\mu\text{g}/\text{g}$) e Zeaxantina (2.4 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1527	1157	1006
16	Casca de pequi (<i>Caryocar vilosum</i>)	Violaxantina, Luteína e Zeaxantina	1522	1170(w)	1001(w)
	Polpa de pequi (<i>Caryocar vilosum</i>)	β -Caroteno (1.2 $\mu\text{g}/\text{g}$), β -criptoxantina (4.4 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1529	1156	1008
17	Cebola roxa (<i>Allium cepa L.</i>)	β -Caroteno	1515	1151	1014
18	Caril	β -Caroteno	1522	-	-
19	Casca de laranja (<i>Citrus aurantium</i>)	β -Caroteno	1531	1156	1012
20	Pimenta verde (<i>Capsicum annum L.</i>)	β -Caroteno (2.7 $\mu\text{g}/\text{g}$), Luteína (7.7 $\mu\text{g}/\text{g}$), Violaxantina (4.6 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1515	1156	1002
21	Manga (<i>Mangífera indica L.</i>)	β -Caroteno (4.6 $\mu\text{g}/\text{g}$)	1529	1153	1010

22	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Licopeno (35.4 µg/g), Luteína (1 µg/g) e β-Caroteno (3.2 µg/g)	1519	1156	1002
23	Milho (<i>Zea mays</i> ,)cru	β-Caroteno (2.6 µg/g), β-criptoxantina (0.6 µg/g), Luteína (4.3 µg/g) and Zeaxantina (4 µg/g)	1527	1155	1004(w)
24	Farinha de milho (<i>Zea diploperennis</i>)	β-Caroteno (0.7 µg/g), β-criptoxantina (1.2 µg/g), Luteína (4.6 µg/g) e Zeaxantina (8.4 µg/g)	1523	1156	1004
25	Polpa de maracujá (<i>Passiflora edulis flavicarpa</i>)	β-Caroteno (4.7 µg/g)	1535/1523	1158	1012
26	Pimenta vermelha (<i>Capsicum baccatum</i>)	β-Caroteno (3.8 µg/g)	1527	1156	1006
27	Chá verde (<i>Camellia Sinensis</i>)	β-Caroteno	1527	1158	1004
28	Cebolinha (<i>Allium schoenoprasum</i>)	β-Caroteno	1527	1158	1006
29	Espinafre (<i>Spinacia oleracea L.</i>)	β-caroteno (32-82 mg/g) e Luteína (42-159 mg/g)	1525	1158	1012(w)
30	Alho (<i>Allium sativum</i>)		1511	1179	1005
31	Polpa de banana (<i>Musa spp.</i>)		1516	1159	1001
32	Guaraná (pó) (<i>Paullinia cupana</i>)		1516	1155(w)	1008
33	Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i>)		1675	1152	1009

34	Erva cidreira (<i>Melissa Officinalis</i>)		1516	-	1005
35	Canela da China (<i>Cinnamomum cassia</i>)		1526	1158	-
36	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum Breyn.</i>)		1517	1160	1000
37	Ameica seca (<i>Prunus armeniaca</i>)		1525	-	-
38	Cascade limão (<i>Citrus X. Limon</i>)		1529	1156	1006 (w)
39	Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)		1523	1155 sh	1021/993
40	Polpa de morango (<i>Fragaria vesca</i>)		1531	1156	1004
41	Pêssego (<i>Prunus pérsica</i>)	zeaxantina + neozeaxantina (4 µg/100g) β-criptoxantina (3 µg/100g)	1519	1154	1004
42	Casca de pera (<i>Pyrus communis</i>)		1527	1151	1006(w)
43	Semente de linhaça (exterior) (<i>Linum usitatissimum</i>)		1528	1172	1001

Para colaborar na interpretação dos espectros das amostras naturais, foram utilizados doze padrões de carotenóides. A Tabela 7 mostra a relação entre estes padrões e seus principais modos vibracionais Raman. É importante ressaltar que obteve-se da literatura (BARNARD, 2005 e RODRIGUES-AMAYA, 1997) as informações de seis dos padrões utilizados neste trabalho (luteína, α -caroteno, crocetina, capsantina, trans e cis bixina, todos em azul na Tabela 7).

Tabela 7. Posição dos números de onda dos modos de ν_1 , ν_2 and ν_3 (em cm^{-1}) de alguns carotenóides padrões obtidos por FT-Raman.

Carotenos Padrão	$\nu_1(\text{C}=\text{C})$	$\nu_2(\text{C}-\text{C})$	$\nu_3(\text{C}-\text{CH}_3)$
β -caroteno	1515	1157	1008
Licopeno	1510	1156	1006
β -Criptoxantina	1520	1157	1008
Astaxantina	1512	1156	1006
Xantofila	1523	1157	1006
Zeaxantina	1520	1158	1006
Luteína	1522	1157	1008
α -caroteno	1521	1157	1006
Crocetina	1536	1165	1020
Capsantina	1517	1158	1004
Cis-bixina	1518	1154	1007
Tran-bixina	1523	1155	1008

4.2 Espectros Raman de amostras reais

Existe uma série de variáveis quando se trata do estudo de carotenóides. Dentre elas, a estratégia de preparo de amostra, metodologia, possíveis fontes de erro, grau de maturidade, parte da planta a ser utilizada, bem como efeitos de tratamento pós-colheita, processamento e estocagem. Além destes fatores, vários autores discutem a importância da biodiversidade, manifestada pela variedade de fontes de carotenóides e os diferentes níveis de carotenóides em frutos e vegetais nativos, cultivados e semicultivados, em relação às culturas produzidas comercialmente. (LATSCHA, 1990).

Estudos quantitativos recentes realizados em três cultivares de mamão (Formosa, Golden e Sunrise) e três cultivares de pêsego (Chiripá, Coral e Diamante) por cromatografia de alta eficiência (HPLC) (SENTANIN, 2007), mostraram alguns resultados interessantes. Os três cultivares de mamão apresentaram composição parecida, com teor médio de licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno variando entre 18,5-23,9, 8,2-11,7 e 0,5-1,2 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Em relação ao pêsego, os cultivares coral e Chiripá apresentaram níveis baixos de carotenóides. O cultivar Diamante (espécie de pêsego estudada neste trabalho) teve um teor total médio de 6,4 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina, o carotenóide principal. É interessante notar que nossos dados para as bandas Raman do mamão fornecem valores de 1524, 1157 e 1008 cm^{-1} para as três bandas estudadas. Se compararmos com os padrões mostrados (Tabela 7), podemos verificar que estes são aparentemente os números de onda da β -criptoxantina, que não é o principal carotenóide presente no mamão. Pelas circunstâncias, a única conclusão que podemos chegar a partir dos espectros Raman, é a presença de pelo menos um carotenóide. A partir disto não está claro qual composto está realmente presente na amostra.

As Figuras 4.1 a 4.8 mostram os espectros Raman obtidos para as amostras que foram investigadas neste trabalho. Como já mencionado anteriormente, algumas amostras não apresentam nenhum estudo na literatura no que se refere à composição química de carotenos ou carotenóides, mas mesmo com essa ausência de informação a presença de algum carotenóide é notada. Como exemplo, temos a banana (*Musa SSP*), o alho (*Allium sativum*) e a semente de linhaça, que apresentam três bandas características de carotenóides (Figura 4.1).

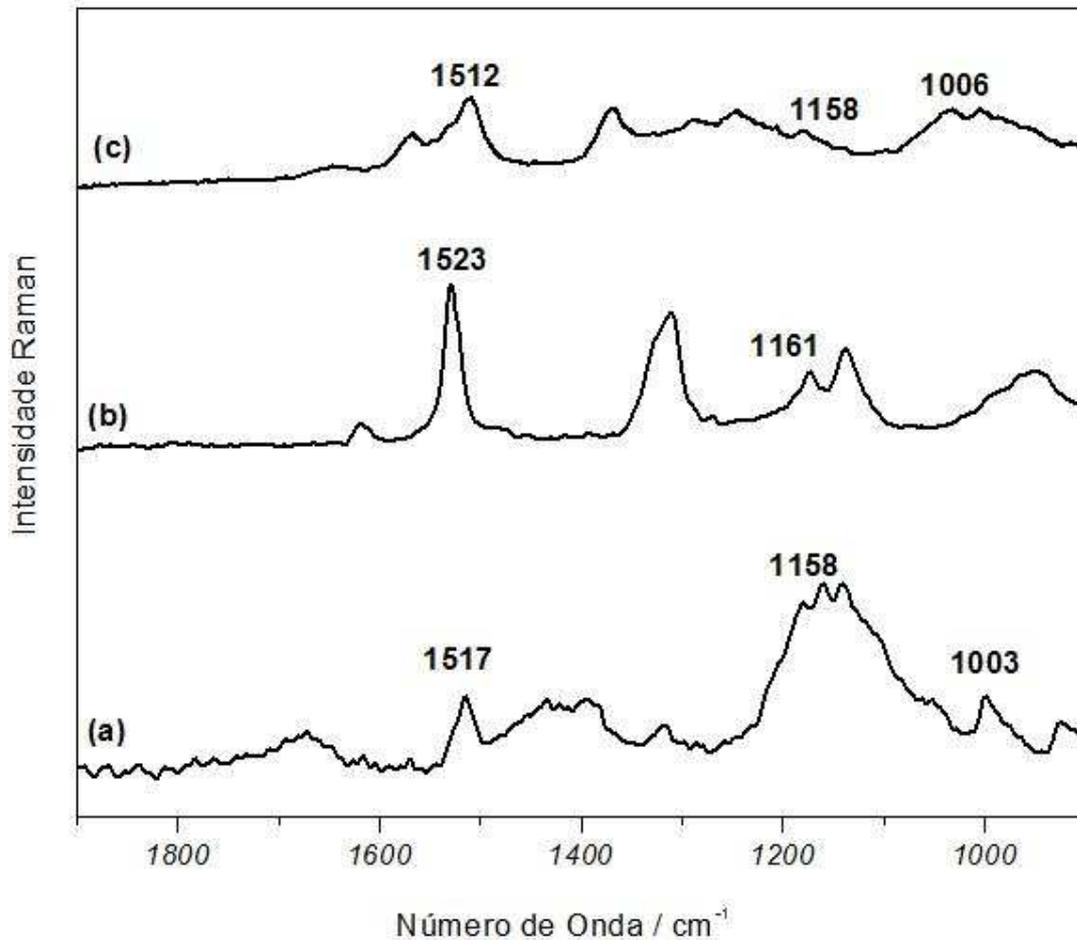


Figura 4.1. Espectros FT-Raman (a) polpa de banana, (b) semente de linhaça e (c) alho

Ao comparar os dados da Figura 4.1 com os números de onda dos padrões (Tabela 7) é possível sugerir, com observações na literatura (RODRIGUES-AMAYA, 1997) que a capsantina, a xantofila e a astaxantina seriam os prováveis carotenóides presentes na polpa de banana, na semente de linhaça e no alho, respectivamente. Os números de onda das bandas das amostras apresentam equivalência e são compatíveis com as dos padrões citados. No entanto, isto é exatamente o contrário do que queremos demonstrar em nossa investigação.

Em uma visão geral dos espectros (Figuras 4.1 a 4.8), pode-se notar que uma grande maioria das bandas presentes são muito largas quando comparadas aos padrões

(Figura 4.2). Um dos fatores que está diretamente associado a este evento, seria a característica química da matriz, ou seja, a grande complexidade da amostra e as diferentes interações nela existente.

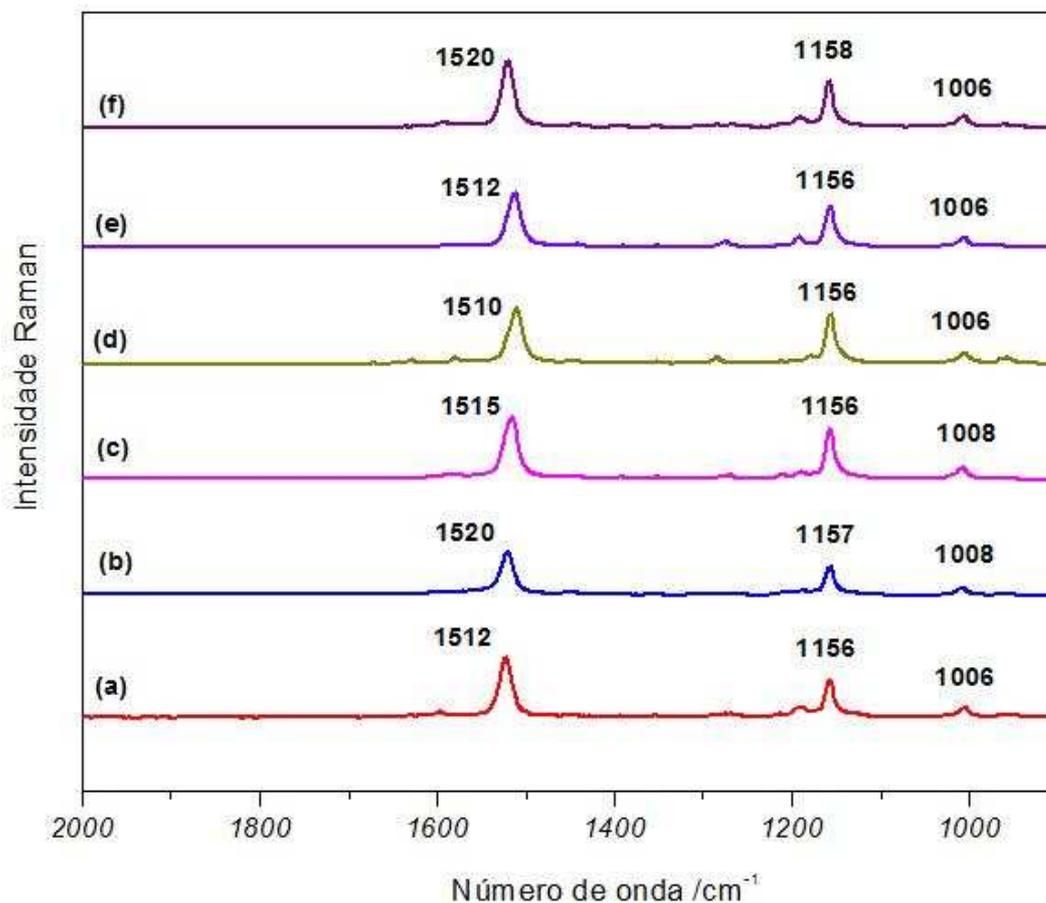


Figure 4.2. Espectros FT-Raman dos padrões: (a) xantofila, (b) β-criptoxantina, (c) β-caroteno, (d) licopeno, (e) astaxantina e (f) zeaxantina.

A principal comparação deve ser feita entre os espectros dos carotenóides provenientes dos tecidos vegetais e os carotenóides que estão realmente presentes nas amostras oriundas dos padrões. Esta comparação entre os espectros tem a ligação C=C como uma banda marcadora, uma vez que esta se mostra com uma maior sensibilidade para o deslocamento do que as demais bandas características dos carotenóides. Como exemplo, podemos citar e comparar o licopeno, um típico carotenóide C11 (onze ligações C=C conjugadas) que apresenta este modo em 1510 cm^{-1} , com a crocetina, um carotenóide C7 (sete ligações C=C conjugadas) apresentando a ligação C=C em 1536 cm^{-1} , ou seja, existe uma variação de 26 cm^{-1} , ao passo que as demais ligações C-C e C-CH₃, variam em 10 cm^{-1} .

Observando-se a Tabela 6, nota-se vários casos onde esta variação entre os números de onda do modo vibracional de estiramento da ligação C=C ocorre. Neste sentido, a abóbora (*Cucurbita pepo L.*), mais precisamente a casca e a polpa, é um bom exemplo desta divergência em destaque e que caracteriza a motivação de realizar este estudo. Neste caso particular, a literatura descreve a presença de β -caroteno (10- 40 $\mu\text{g/g}$) e α -caroteno (0.1 $\mu\text{g/g}$) na polpa (NASCIMENTO, 2006 e SILVA *et al.* 2002), e β -caroteno (17 $\mu\text{g/g}$), luteína (10 $\mu\text{g/g}$) e zeaxantina (2,4 $\mu\text{g/g}$) na casca (SCHULZ *et al.* 2005 e CHEN *et al.* 2004) todos estes carotenos contêm nove ligações duplas carbono-carbono conjugadas na cadeia poliênica. Comparando todos esses carotenóides C9 com seus respectivos padrões (Tabela 7), notamos uma grande variação do seu modo principal de vibração, uma vez que no espectro Raman da abóbora (Figura 4.3 espectros (e) e (f)) pode-se observar a banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ em 1527 cm^{-1} , enquanto que tal banda para os padrões varia de 1515 cm^{-1} (β -caroteno) a 1522 cm^{-1} (luteína).

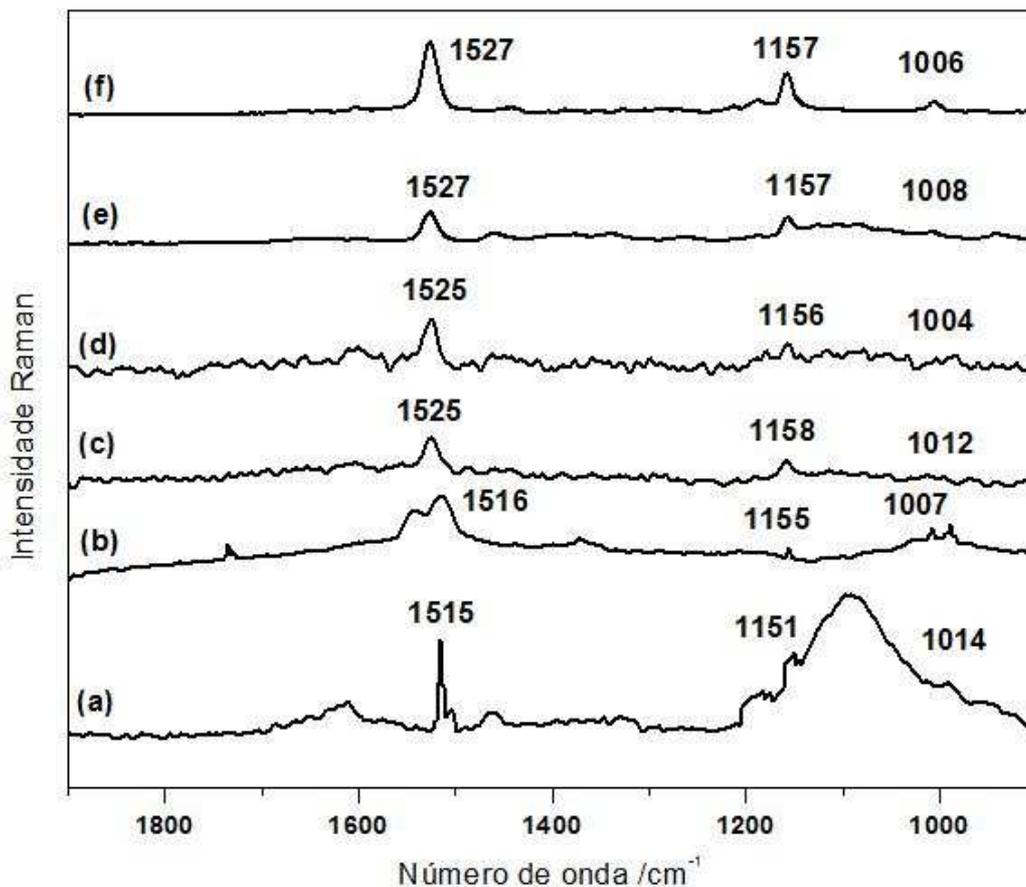


Figura 4.3. Espectros FT-Raman de: (a) cebola roxa, (b) batata doce, (c) espinafre, (d) alface manteiga, (e) polpa de abóbora e (f) casca de abóbora

Outro exemplo é fornecido pelos dados obtidos da manga (*Mangifera indica*), que contém somente β -caroteno ($4.6 \mu\text{g/g}$) (CHEN, 2004; RODRIGUES-AMAYA, 2008; e BHASKRACHA *et al.*, 1995). O espectro Raman (Figura 4.4 (a)) mostra a banda referente ao modo $\nu(\text{C}=\text{C})$ em 1529 cm^{-1} ; porém, o espectro do β -caroteno mostra tal banda em 1515 cm^{-1} . Neste contexto um deslocamento de 14 cm^{-1} é suficiente para sugerir, se já não fosse conhecido na literatura como carotenóide principal (β -caroteno) realmente presente no tecido da manga, que os dados do espectro Raman identificam um carotenóide que não aparece em nossa lista de padrões; uma possibilidade para este “outro” carotenóide seria de apresentar talvez sete ou oito ligações poliênicas conjugadas $\text{C}=\text{C}$. Portanto, uma vez que não se conhece previamente o carotenóide presente em alguma natural, pode se tornar errôneo qualquer tipo de afirmação no que diz respeito ao carotenóide predominante.

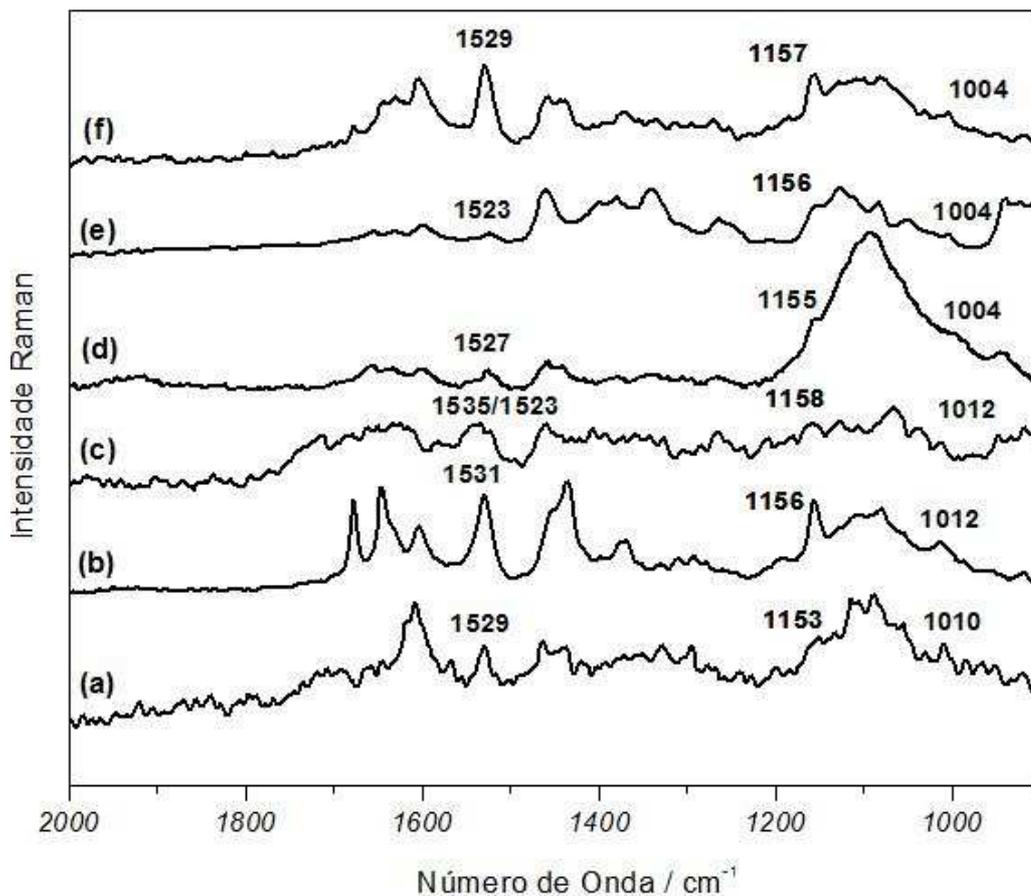


Figura 4.4. Espectros FT-Raman (a) manga, (b) casca da laranja, (c) polpa de maracujá amarelo, (d) milho (e) milho processado e (f) nectarina.

Em um estudo recente, Blanch (BLANCH *et al.*, 2007) investigaram a estabilização do licopeno obtido do tomate por encapsulamento utilizando α , β e γ ciclodextrina (CD). Além de demonstrar a estabilização do licopeno encapsulado, foi observado um significativo deslocamento do número de onda de algumas bandas para região de alto número de onda, principalmente na região da ligação C=C, indicando que o carotenóide sofreu algum tipo de mudança estrutural após a complexação com a CD. Ainda segundo os autores, a interação entre o licopeno e a CD promove uma diminuição do grau de deslocalização eletrônica na cadeia poliênica, em razão de uma mudança conformacional sofrida na molécula, que por sua vez, é reforçada pela forte interação intermolecular, que ocorre entre o licopeno e a cavidade interna da matriz CD.

Acreditamos que a conclusão alcançada por Blanch e colaboradores, parece ser aplicável em nossa investigação, onde as amostras de tecidos de plantas contendo os carotenóides são complexas matrizes orgânicas, provavelmente contendo espécies de carotenóides unidas por interações intermoleculares em moléculas de celulose e outras componentes da estrutura biológica. Esta conclusão pode justificar a não consonância entre os espectros padrões e as espécies naturais.

Baranski (BARANSKI *et al.*, 2005 e SCHULZ *et al.*, 2005) relataram em um elegante estudo a detecção de β -caroteno e outros carotenóides (licopeno, α -caroteno e luteína) nos tecidos de plantas, mais especificamente a cenoura. A presença dos carotenóides pode ser vista em quase todas as partes da raiz, mais especificamente, entre as seções da raiz, caracterizada pelas cores laranja, amarelo, vermelho e roxo, que aumentam gradativamente a partir da periderme em direção ao núcleo, havendo declínio no teor de carotenóides nas células próximo ao câmbio vascular. Estes resultados indicam uma regulação do desenvolvimento dos genes dos carotenóides em raízes de cenoura e os autores afirmam que se pode usar a espectroscopia Raman para fornecer informações sobre a origem dos carotenóides na expressão gênica e também na regulação. Nesse estudo, os autores atribuíram as bandas Raman observadas em 1520 cm^{-1} para o β -caroteno, 1510 cm^{-1} para o licopeno e 1527 cm^{-1} para α -caroteno/luteína; todas estas espécies são carotenóides C9 conjugados.

De acordo com nossos dados para os padrões (Tabela 6), os números de onda para o β -caroteno e α -caroteno/luteína também apresentam diferenças significativas em comparação com os padrões adequados, que são 1515 e $1521/1522\text{ cm}^{-1}$. O resultado do licopeno neste contexto é anômalo, uma vez que seu respectivo número de onda que aparece no tecido vegetal é idêntico ao do padrão relatado, que está situado em 1510

cm^{-1} . Mais uma evidência indiscutível de que não está claro o real caroteno ou carotenóide presente em amostras naturais.

Para fins de comparação, (BARANSKA *et al.* 2005) relatou em um artigo recente a determinação analítica de licopeno e β -caroteno em tomates e produtos relacionados usando excitação em 1064 nm. No espectro obtido pelos autores uma banda em 1510 cm^{-1} é observada no purê de tomate, que apresenta um ombro localizado em números de onda mais elevados. Em um processo de deconvolução (tratamento matemático baseado num algoritmo) este ombro se define como uma banda em 1520 cm^{-1} (considerar apenas inserção na Figura 4.5, retirada do artigo).

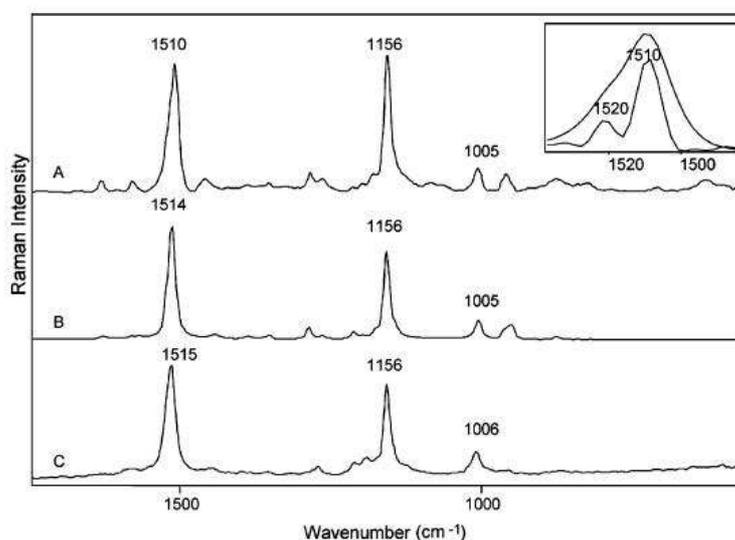


Figura 4.5. Espectro do purê de tomate (A), mostrando o tratamento de deconvolução do ombro entre 1500 e 1520 cm^{-1} (BARANSKA *et al.* 2005)

Os autores apresentam uma interessante discussão sobre a diferença entre os números de onda obtidos para as amostras de frutas e os carotenóides padrão. O deslocamento é atribuído a uma forte interação entre os carotenóides que ocorrem naturalmente nas matrizes das plantas, que mudam sua estrutura química ou física, portanto influenciando o número de onda da banda vibracional observada. O problema com esta interpretação é que essa interação deve perturbar todos os modos de vibração, talvez em graus diferentes, mas as outras importantes bandas de carotenóides, estiramentos C-C e C-CH₃ (ν_2 e ν_3), permanecem inalterados. No entanto, o aparecimento de duas bandas no espectro tratado indica a presença de dois diferentes carotenóides, apesar dos valores dos números de onda não se mostrarem claros se realmente trata-se de uma fonte de carotenóide. O licopeno, como pode ser visto na

Tabela 6, tem onze ligações C = C conjugadas na estrutura, ao passo que β -caroteno tem apenas nove ligações C=C na cadeia poliênica. Ambos os compostos, quando analisados separadamente, apresentam bandas Raman de estiramento C = C em 1510 e 1515 cm^{-1} , respectivamente, e pode-se notar que o número de onda da banda ν_1 mostra-se em menor valor de número de onda a partir do aumento do comprimento da cadeia poliênica conjugada. Esta característica está diretamente relacionada com o forte efeito de deslocalização eletrônica, também conhecido como acoplamento elétron-fonon (WITHNALL *et al.*, 2002 e MILANI *et al.*, 2009), presente nos carotenos e carotenóides. Isto significa que quando se aumenta o número de conjugações, ocorre uma diminuição da diferença de energia da transição eletrônica.

Alguns pontos menores também podem ser discutidos através da análise dos espectros Raman das amostras investigadas; por exemplo, a canela (ambas as espécies), o guaraná (Figura 4.6) ou mesmo a beterraba e a polpa de morango (Figura 4.7), que contêm claramente carotenóides, não podem ser descritos exatamente pelo teor (quantidade) de carotenóides uma vez que os números de onda das bandas Raman principal não são capazes de identificar com certeza quais os carotenóides estão realmente presentes na amostra, a princípio o que pode ser feito é simplesmente uma aproximação com os valores de número de onda dos padrões.

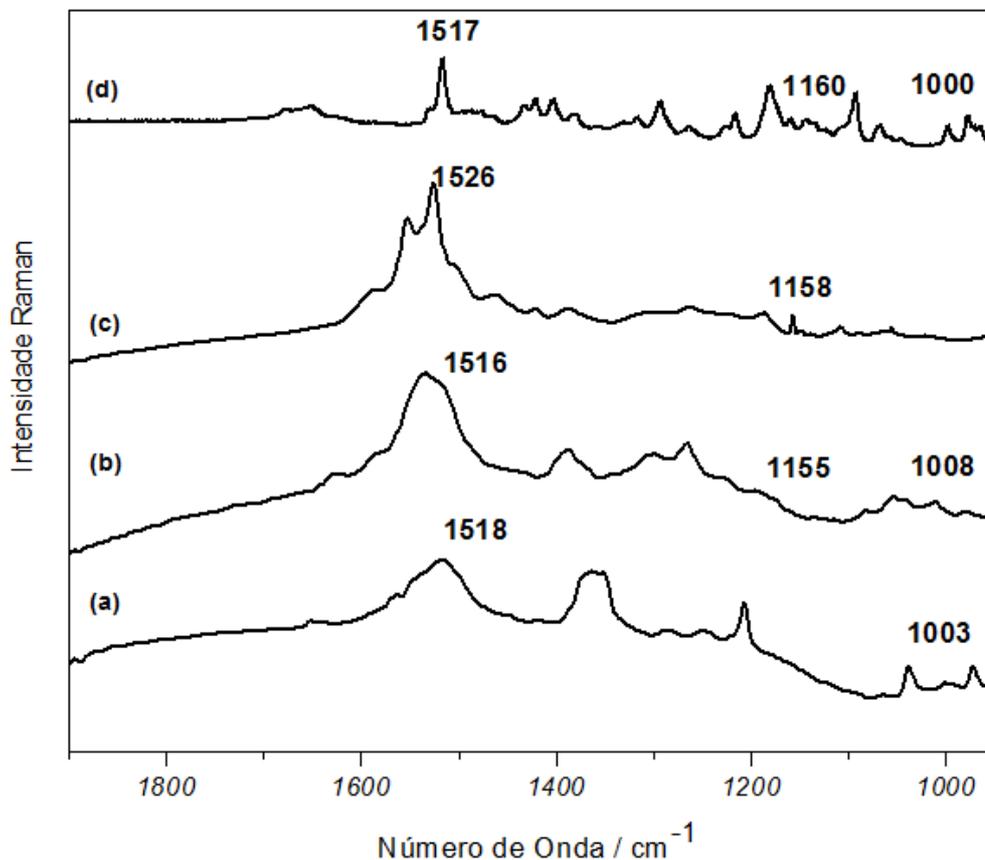


Figura 4.6. Espectros FT-Raman (a) nos moscada(fruta), (b) guaraná(pó), (c) canela da china e (d) canela

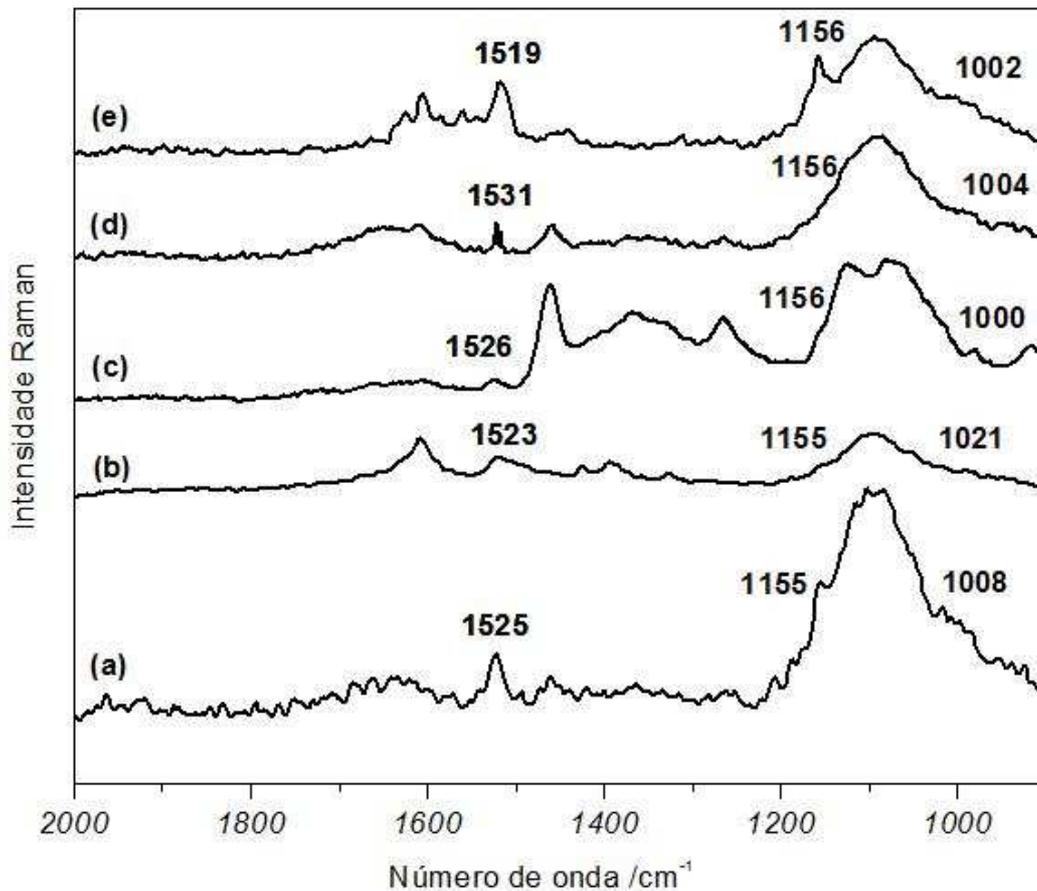


Figura 4.7. Espectros FT-Raman (a) polpa de mamão, (b) beterraba, (c) damasco, (d) polpa de morango e (e) tomate.

Uma característica interessante também ocorre nas amostras de pimenta (verde e vermelha). De acordo com a literatura (RODRIGUES-AMAYA, *et al.*, 2008; CHEN, *et al.*, 2004 e BHASKARACHA, *et al.*, 1995) a luteína é o principal carotenóide presente na pimenta verde, com 7.7 $\mu\text{g/g}$. Para a pimenta vermelha, temos a presença do β -caroteno com uma quantidade de 3.8 $\mu\text{g/g}$. Ao analisar o espectro Raman (Figura 4.8) nota-se que o principal modo vibracional $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ aparece em 1515 e 1527 cm^{-1} para a pimenta verde e vermelha, respectivamente. Ao comparar com os padrões de luteína e β -caroteno (Tabela 7), que apresentam tais bandas em 1522 e 1515 cm^{-1} , torna-se claro a divergência entre os valores, uma variação de 7 cm^{-1} para a pimenta

verde e de 12 cm^{-1} para pimenta vermelha. Este dado enfatiza mais uma vez o quanto a matriz onde os carotenóides estão inseridos pode influenciar em sua caracterização espectroscópica, e desta forma torna-se difícil uma discriminação clara de qual carotenóide realmente está presente numa determinada amostra.

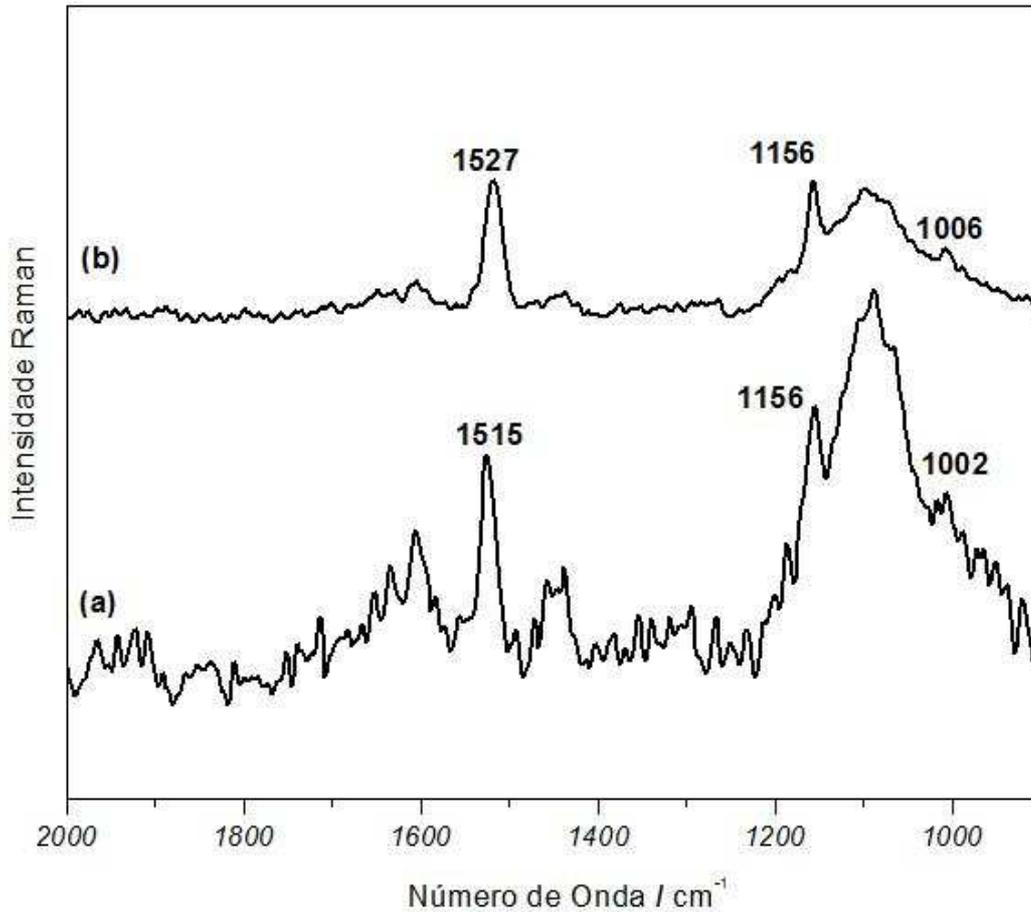


Figura 4.8. Espectros FT-Raman (a) pimenta verde e (b) pimenta vermelha.

Praticamente todas as espécies investigadas neste estudo apresentaram algum tipo de interferência com o ambiente químico inserido, neste sentido podemos exemplificar mais dois exemplos: o açafrão e o urucum. O primeiro é predominantemente extraído dos estigmas de flores de uma variedade de *Crocus sativus*, uma planta da família das Iridáceas, sendo utilizado desde a antiguidade como especiaria, principalmente na culinária mediterrânea. Foram obtidos os espectros desta planta a partir de dois tipos diferentes de espécies, o açafrão-da-terra e o açafrão amarelo, que apresentam bandas em 1517, 1166 e 1000, e 1517, 1155 e 1008 cm^{-1} ,

respectivamente, para $\nu_1(\text{C}=\text{C})$, $\nu_2(\text{C}-\text{C})$ e $\nu_3(\text{C}-\text{CH}_3)$. Além da diferença entre as duas amostras, o que provavelmente advém da diferença de tratamento da matéria-prima, a comparação com os espectros Raman de β -caroteno é muito realista, uma vez que as bandas Raman para β -caroteno estão presentes em 1515, 1156 e 1008 cm^{-1} ; entretanto, ao contrário do que se poderia esperar, a crocetina é seu principal carotenóide e apresenta bandas em 1536, 1165 e 1020 cm^{-1} respectivamente para ν_1, ν_2 e ν_3 (Tabela 7).

O urucum é um corante de cor laranja amarelado obtido do pericarpo de sementes de *Bixa orellana* L., uma árvore típica de florestas tropicais e conhecida como "urucum" na América Central e América do Sul. A bixina ou *cis*-bixina é o principal corante obtido das sementes de *Bixa orellana* (CAMARGO, 1985). Esta ocorre naturalmente na forma *cis*; no entanto, durante o processo de extração, sofre isomerização para a forma *trans*, sendo nomeada isobixina (SÁ, 2003). O principal componente das sementes de urucum é o geranilgeraniol, representando 1% das sementes secas, o percentual relativo de bixina em relação ao geranilgeraniol é em torno de 1:345. A norbixina ($\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$) é um derivado da bixina, e apesar de ocorrer naturalmente, quase sempre é referido como o produto da saponificação da bixina (MERCADANTE *et.al.*, 1997 e MERCADANTE *et.al.*, 1999), sendo esta a forma comercial.

Em uma investigação do nosso grupo (OLIVEIRA, *et al.*, 1997), o carotenóide foi isolado a partir das sementes e foi realizado um estudo via espectroscopia Raman ressonante, onde as bandas foram observadas em 1525 e 1155 cm^{-1} para ν_1 (C=C) e ν_2 (C-C), respectivamente. Comparando com os resultados aqui apresentados, há um deslocamento de 7 cm^{-1} para o modo ν (C = C), e 1 cm^{-1} para o modo ν (C-C), o que novamente reforça a idéia que esse modo particular de vibração (ν_1) é o mais afetado pelo ambiente químico onde está inserido o carotenóide.

Como discutido ao longo de todo texto, a Tabela 7 mostra os números de onda Raman de diversos carotenóides diferentes. Todos eles apresentam nove ligações conjugadas (C9), exceto a crocetina e o licopeno, que apresentam sete (C7) e onze (C11) ligações duplas conjugadas respectivamente. As bandas Raman, obtidas com uma resolução espectral de até 3 cm^{-1} , mostram claramente uma variação de ν_1 de 1512 para 1522 cm^{-1} , referente ao carotenóide C9, ao passo que essa mesma banda pode ser vista em 1510 cm^{-1} no espectro do licopeno, um carotenóide C11. Por outro lado, a banda ν_1 pode ser vista em 1536 cm^{-1} no espectro da crocetina, um carotenóide C7.

4.3 Sistemas sintéticos contendo oligossacarídeos

4.3.1 Complexos de inclusão

Foram preparados e estudados quatro complexos de inclusão utilizando a β -ciclodextrina. Reportamos em detalhes os resultados obtidos com quatro moléculas de carotenóides (β -caroteno, zeaxantina, norbixina e licopeno) que foram microencapsuladas. Neste trabalho concentramos a atenção em observações e conclusões sobre a posição das bandas referentes aos carotenóides, mas principalmente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$.

Devido a sua estrutura, as ciclodextrinas (CD's) possuem a propriedade de encapsular completamente, ou ao menos, parcialmente dentro de sua cavidade interna hidrofóbica uma grande variedade de moléculas hóspedes (sólidas, líquidas ou gasosas) dentro de sua cavidade interna, formando os chamados complexos de inclusão. A formação do complexo é proveniente de um ajuste dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula hóspede. A efetividade da complexação depende deste ajuste e de interações locais específicas entre os átomos da superfície de ambos, hóspede e hospedeiro. A cavidade lipofílica da CD proporciona um microambiente de tamanho apropriado para a localização de moléculas não-polares. A inclusão de uma molécula na cavidade da CD não provoca a quebra nem a formação de ligações covalentes e é, essencialmente, uma substituição de uma molécula de água inclusa por uma outra menos polar. Este processo é uma interação energeticamente favorável da molécula hóspede não-polar com a cavidade hidrofóbica solvatada. (ATWOOD *et al.*, 1996; e DEL VALLE, 2004).

A formação do complexo compreende os seguintes passos:

(i) as moléculas de água escapam da cavidade da CD e sua energia será correspondente àquela no estado gasoso. Como consequência, interações de van der Waals e o número de ligações de hidrogênio diminui, enquanto os graus de liberdade translacional e rotacional tridimensional das moléculas de águas libertas aumentam;

(ii) a energia conformacional do anel da CD diminui na relaxação no caso da α ou β -CD;

(iii) a molécula hóspede apolar desfaz sua hidratação .

(iv) a molécula hóspede entra na cavidade vazia da CD e o complexo é estabilizado por interações de van der Waals e, algumas vezes, por ligação de hidrogênio. A molécula hóspede mantém apenas um grau de liberdade rotacional.

(v) a estrutura da água é restabelecida ao redor da parte exposta da molécula hóspede, e integra com a esfera de hidratação do anel da CD (ATWOOD *et al.*, 1996).

A habilidade das CDs em formar complexos de inclusão com moléculas hóspedes é decorrente de dois fatores: o primeiro é estérico e depende da relação entre os tamanhos do hóspede e do hospedeiro; o segundo fator deve-se às interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema (CD, hóspede, solvente) (Del Valle, 2004). Porém, os complexos de inclusão podem alterar as propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes (TOMMASINI *et al.*, 2004)

Os complexos de inclusão formados podem ser isolados como substâncias cristalinas estáveis. Após a dissolução destes complexos, um equilíbrio é estabelecido entre as espécies dissociadas e associadas, e isso é expresso pela constante de estabilidade do complexo K_a . A associação da CD e a molécula hóspede (H), e a dissociação do complexo formado CD/hospede é governado por um equilíbrio termodinâmico: (Del Valle, 2003)



$$K_{1:1} = \frac{[CD \cdot H]}{[CD][H]} \quad (2)$$

Uma molécula que apresenta propriedades adequadas vai interagir com a CD dentro da cavidade sem formar ligações covalentes; esta interação é do tipo “hóspede / hospedeiro”.

Complexos de inclusão CD são formados principalmente por meio da substituição da água inclusa pela molécula “hóspede”. Em meio aquoso, a cavidade interior das CDs é ocupada por moléculas de água através de uma interação fraca, energeticamente desfavorável. Esta adversidade de energia corresponde à redução da superfície de contato entre o solvente e soluto, o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água (Figura 4.9) (SZEJTLI, 1998). Alguns outros fatores, tais como ligações de hidrogênio, alterações na tensão superficial, interações de van der

Waals, e liberação da tensão do anel, também podem ter alguma influência sobre a formação do complexo.

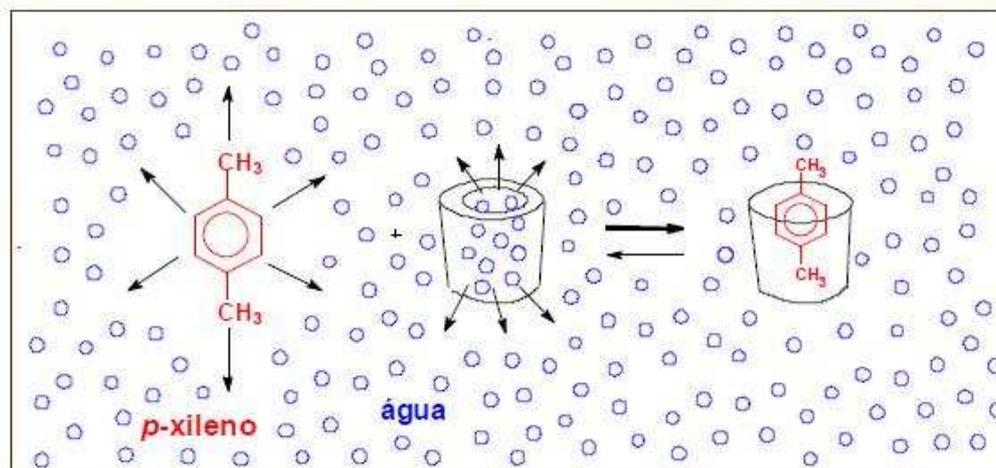


Figura 4.9. Exemplo de inclusão de uma molécula (p-xileno) na CD em meio aquoso (SZEJTLI, 1998).

A complexação é geralmente um processo dependente da concentração e da razão molar (1:1, 1:2, 2:1) “hóspede/hospedeiro”. É possível que, em solução a molécula interaja com a superfície externa da CD e os complexos formados aglomeram-se por auto-associação (LOFTSSON *et al.*, 2004).

Neste trabalho, optou-se por uma concentração em excesso de β -CD(1:100), uma vez que as amostras dos carotenóides padrão foram utilizados (licopeno, norbixina, β -caroteno, zeaxantina) em quantidades muito pequenas, e este fator dificultou a medida dos mesmos. Portanto uma maior quantidade de CD foi fundamental para conseguirmos um bom rendimento. O tempo (aproximadamente sete dias) mostrou-se eficiente pra obter quatro complexos β -CD/carotenóides.

Moléculas “hóspedes” hidrofóbicas como β -caroteno podem ser incorporadas na cavidade da ciclodextrina pelo deslocamento de água. O complexo resultante é solúvel em água, embora a molécula hóspede possa ser liberada com relativa facilidade (ARIKAN, 2000).

O procedimento experimental para a complexação foi seguido de uma mesma maneira para todos os carotenóides, e os resultados foram semelhantes no que se refere à estabilidade e facilidade de formação do produto final. Houve todo um monitoramento (formação de precipitado, mudança de cor) no meio reacional onde foi verificado que o tempo médio para formação do complexo foi de sete dias. E este foi confirmado com

análise dos espectros. A estabilidade foi avaliada após um período de quarenta dias de monitoramento, em temperatura ambiente, deixando o complexo formado e o respectivo carotenóide, neste caso (norbixina e β -caroteno) em exposição à luz. Foi notado que todos os complexos mantiveram-se estáveis à luz, uma vez que não apresentaram nem um tipo de degradação. Ao contrário, a norbixina e o β -caroteno (em sua forma livre) apresentaram uma efetiva mudança visual sugerindo a oxidação dos mesmos. É interessante salientar que a forma livre para o astaxantina e o licopeno não foram utilizadas, uma vez que a quantidade era muito pequena, portanto para estes não foi possível compará-las com o respectivo complexo. Uma análise mais detalhada sobre a inclusão está discutida através dos resultados espectroscópicos.

A vibração da ligação C = C pode ser vista em um intervalo de números de onda variando entre 1510 cm^{-1} para o licopeno (com onze ligações C = C conjugadas) a 1536 cm^{-1} para crocetina (contendo sete ligações C = C) (Tabela 7). Em nosso estudo esses são os dois padrões que apresentam valores extremos de números de onda, portanto através das bandas localizadas nesta região do espectro, temos uma faixa de confiança para sugerir com maior precisão como o deslocamento de onda será influenciado.

Os espectros Raman obtidos com β -CD/carotenóide (Figura 4.10) mostram bandas que correspondem ao caroteno equivalente, mas com um nítido deslocamento, sugerindo assim a formação do complexo de inclusão. Fica evidente que para cada caroteno houve diferentes mudanças no número de onda. De acordo com a Figura 4.10, podemos dizer que o complexo β -CD/licopeno apresenta um acentuado deslocamento de 14 cm^{-1} referente à banda ν (C = C), isto é, o licopeno em sua forma livre apresenta esta banda em 1509 cm^{-1} , ao passo que seu respectivo complexo em 1523 cm^{-1} . Com um deslocamento um pouco menor temos o complexo β -CD/norbixina que apresenta um deslocamento de 10 cm^{-1} referente a sua principal banda ν (C = C), que está presente em 1517 cm^{-1} na sua forma livre e em 1527 cm^{-1} na forma complexada. Para o terceiro complexo, β -CD / β -caroteno, temos um deslocamento de 8 cm^{-1} no seu principal modo ν (C = C), o qual apresenta-se em 1515 cm^{-1} para a forma não complexada e em 1523 cm^{-1} após o processo de inclusão. Por fim o complexo β -CD/astaxantina sofre um pequeno deslocamento na banda ν (C = C) de 4 cm^{-1} , isto é, a banda da astaxantina livre está em 1511 cm^{-1} e sua forma complexada em 1515 cm^{-1} .

Através da Figura 3.3, nota-se que todos os carotenóides estudados, com exceção do licopeno, apresentam grupos terminais volumosos (a norbixina com grupos

carboxílicos, o β -caroteno com grupos alicíclicos e a astaxantina com grupos alicíclicos e carbonílicos) característica que propicia um impedimento estérico relativamente grande, e como consequência, uma maior dificuldade na obtenção dos respectivos compostos de inclusão, justificando assim os diferentes deslocamentos.

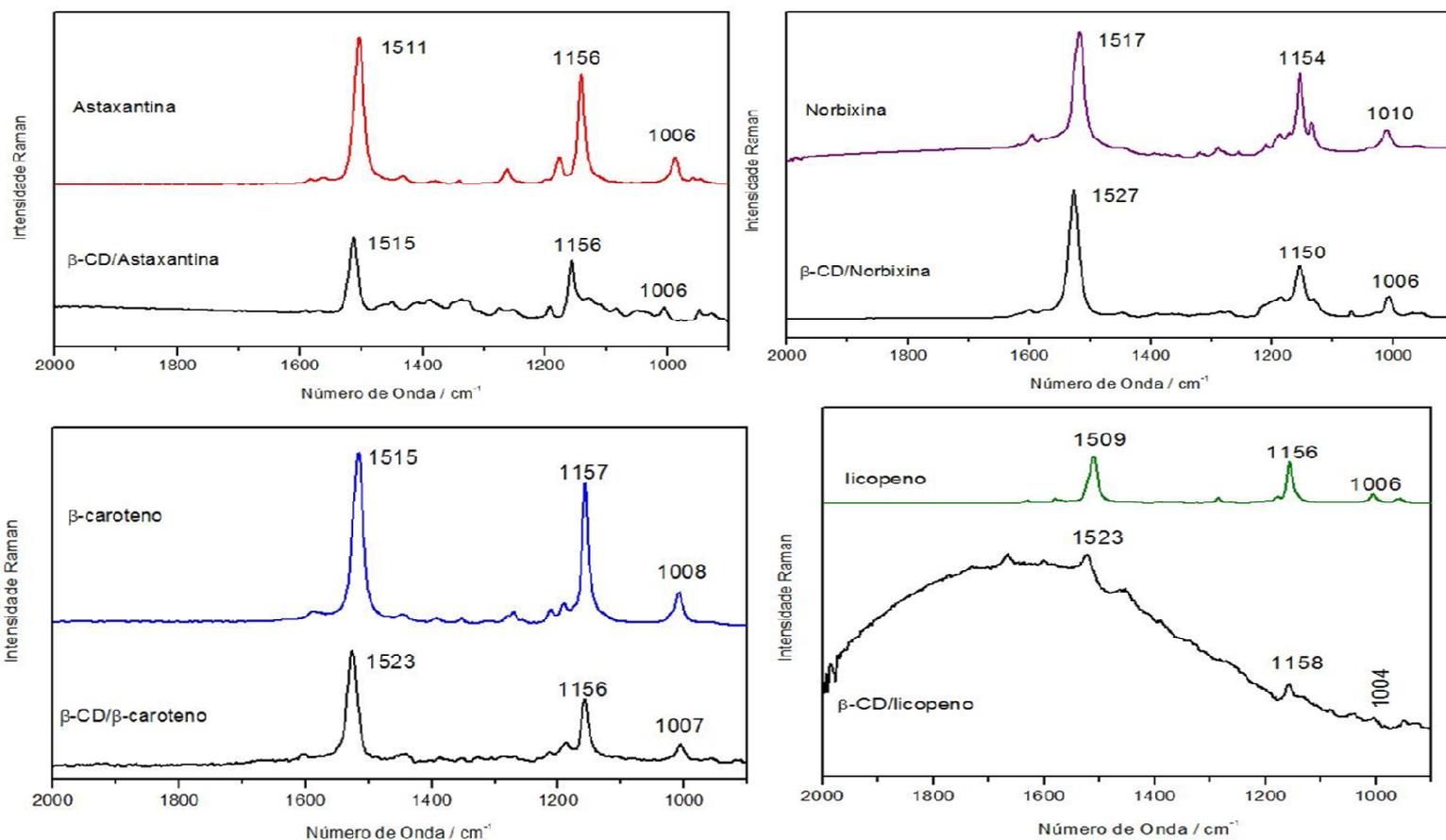


Figura 4.10. Espectros Raman dos complexos β -CD/carotenóides.

Uma interpretação sugerida para o β -caroteno e a astaxantina, que apresentaram os menores deslocamentos, seria a sua isomerização (LAMCHRFI *et al.*, 1995) para forma *cis* formada durante o processo de complexação com a β -CD. Além do possível fato de mudança conformacional para ambos, a diferença entre os valores de deslocamento (8 cm^{-1} β -caroteno e 4 cm^{-1} astaxantina) reside no fato dos grupos terminais serem de tamanhos diferentes, o que implica diretamente que moléculas com maior impedimento estérico, sofrem menos deslocamento no número de onda em questão, sugerindo uma relativa dificuldade na inclusão. Para a molécula de norbixina, que apresentou um deslocamento um pouco maior (10 cm^{-1}), esta apresenta um grupo

terminal menor, e a carboxila presente nesta molécula promove interações intermoleculares (FROMMING, *et al.*, 1994) com a cavidade interna da β -CD, sugerindo uma maior efetividade na formação do complexo. A nossa quarta molécula e que apresentou o maior deslocamento (14 cm^{-1}) é o licopeno. Este é o único carotenóide estudado neste contexto, que não apresenta grupos volumosos o que sugere uma efetiva inclusão, uma vez que não há impedimento estérico. Além disso, existe uma grande possibilidade de um duplo encapsulamento (Figura 4.11), o que justificaria o acentuado deslocamento de onda.

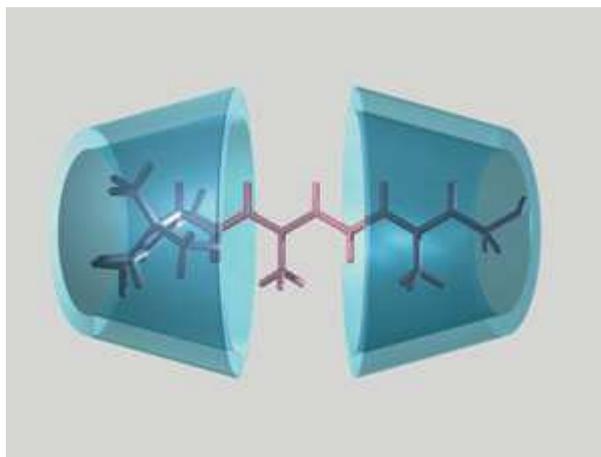


Figura 4.11. Duplo encapsulamento.

Uma das principais maneiras para verificar se realmente a reação foi eficaz e então afirmar que o processo de inclusão ocorreu, é verificar o espectro da mistura física entre os reagentes utilizados. As Figuras 4.12 e 4.13 mostram respectivamente os espectros das misturas físicas, ou seja, a mistura entre a β -CD com cada carotenóide e o espectro Raman da β -CD na sua forma pura. Através deste podemos concluir que a β -ciclodextrina interagiu somente fisicamente, uma vez que o principal modo de estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ dos carotenóides não foi afetado. Se recorrermos a Figura 4.10 e compararmos com a Figura 4.12 torna-se conclusivo que as bandas apresentadas são claramente dos carotenóides na sua forma livre, ou seja, 1509 cm^{-1} para o licopeno, 1517 cm^{-1} para norbixina, 1511 cm^{-1} para astaxantina e 1515 cm^{-1} para o β -caroteno.

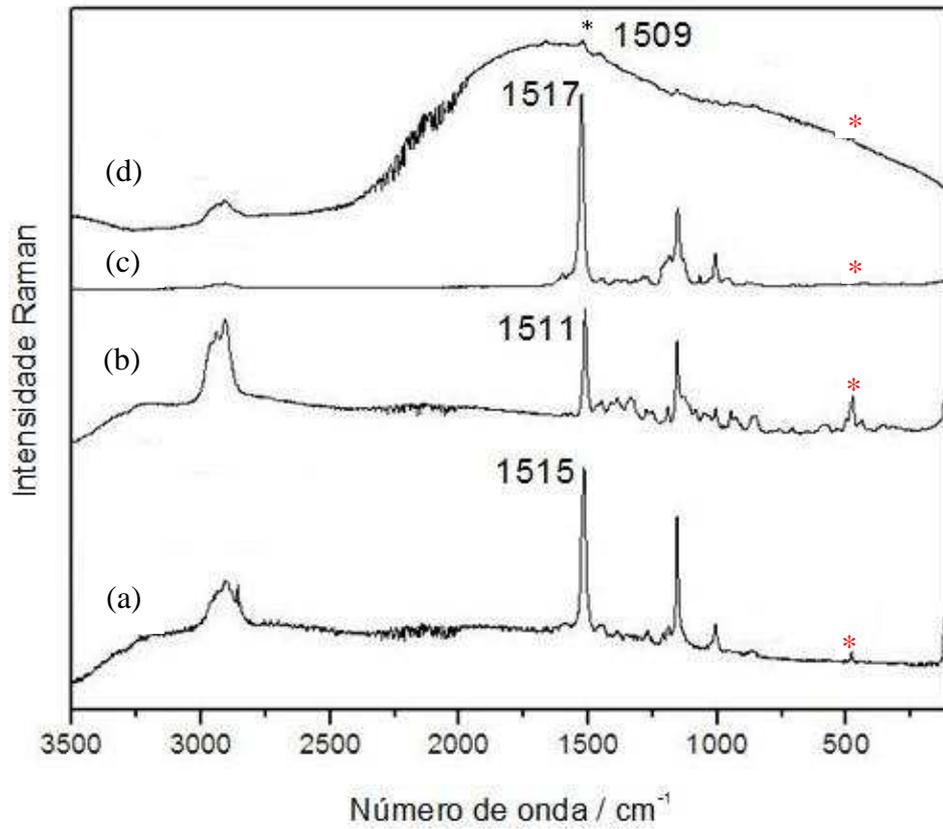


Figura 4.12. Espectros das misturas físicas a) β -CD+ β -caroteno, b) β -CD+astaxantina, c) β -CD+norbixina e d) β -CD+licopeno.

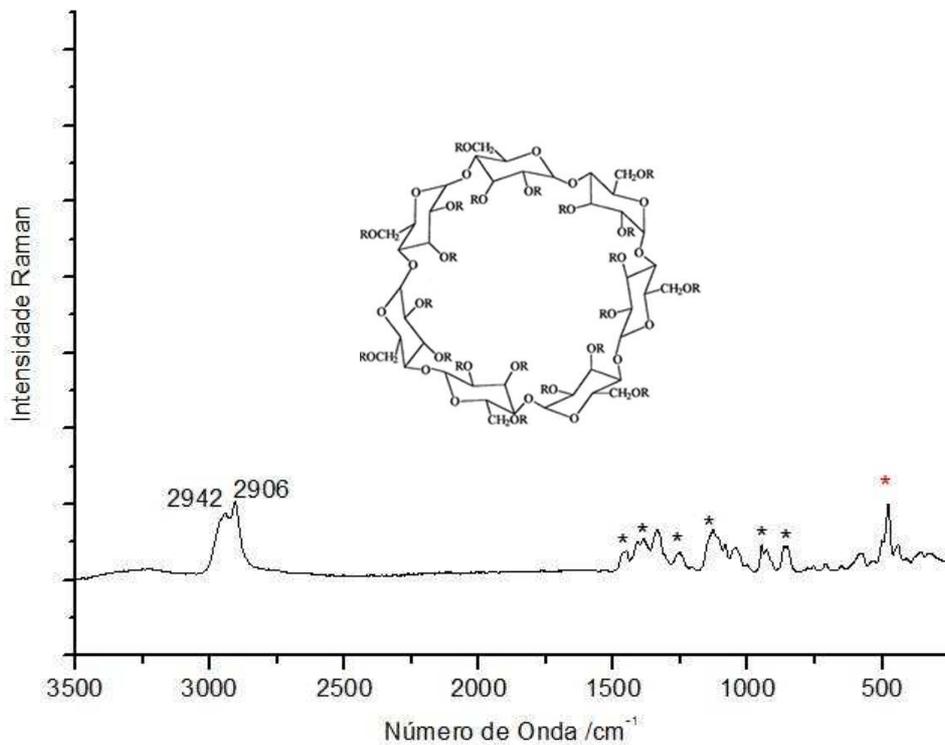


Figura 4.13. Espectro da β -Ciclodextrina pura.

Na região de baixa frequência da β -Ciclodextrina (Figura 4.13) existem alguns modos vibracionais característicos (demarcado em asterisco). Podemos atribuir a região de 1454 cm^{-1} como uma deformação $\delta(\text{CH}_2)$; um sinal amplo entre 1400 e 1300 cm^{-1} atribui-se a deformação $\delta(\text{OH})$; as bandas presentes na região de $1150 - 1000\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{CO})$; na região de 950 cm^{-1} aparece o modo de estiramento $\nu(\text{CC})$ e as bandas que se apresentam na região de $850 - 700\text{ cm}^{-1}$ é devido ao modo vibracional $\rho(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{OH})$ respectivamente. Bandas abaixo dessas regiões são atribuídas a vibrações do esqueleto da molécula (TU, 1982). É importante salientar que uma dessas bandas, presente em 478 cm^{-1} (asterisco vermelho), é relativamente mais intensa quando comparado com as outras, e um fato interessante consiste no seu aparecimento na Figura 4.12, o que confirma que o sistema foi modificado pela mistura física.

Através dos dados mostrados e analisados, foi possível verificar como que os carotenóides são diretamente influenciados por uma matriz onde está inserido. Característica que pode ser justificada pelos diferentes deslocamentos de onda ocorridos no sistema em estudo.

5 Conclusões

Os resultados do corrente estudo indicam que os espectros Raman do grupo de carotenóide C7-C9-C11 não podem ser utilizados para uma discriminação clara entre os membros individuais do grupo, baseado na observação das três bandas características atribuíveis aos carotenóides sozinhos. Acontece que a interação molecular entre os carotenóides e, provavelmente uma molécula de celulose no tecido vegetal, é responsável por isso o que significa que os espectros Raman dos carotenóides que conduzem a uma atribuição aparentemente definitiva da origem, devem ser interpretados com alguma limitação. O número de onda para estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ é o mais sensível à complexidade da matriz onde o carotenóide é biologicamente envolvido, uma vez que existe uma dependência com extensão da deslocalização- π , isto é, o “comprimento efetivo da conjugação”(número máximo de ligações duplas conjugadas).

As implicações para a atribuição definitiva dos carotenóides em tecidos vegetais ou microbiológicos são notáveis, especialmente onde nenhum conhecimento prévio do carotenóide é fornecido. Portanto se torna inevitável não generalizar atribuições a um determinado carotenóide específico, uma vez que existe uma dependência direta com o meio onde ele está presente. Logo cada ambiente químico onde se encontra um carotenóide é exclusivo.

A utilização de um sistema sintético com a β -ciclodextrina/carotenóides teve como seu foco principal esclarecer de uma forma mais clara, como o ambiente químico ou a matriz pode influenciar diretamente nos dados espectroscópicos.

De acordo com os principais requisitos de análise para a microencapsulação, os carotenóides foram adequados para o procedimento de complexação. A compatibilidade dos mesmos com a cavidade da β -ciclodextrina, o preenchimento da mesma e as características hidrofóbicas da molécula “hóspede” foram decisivos no deslocamento dos números de onda no espectro Raman.

Comparando com os demais carotenóides estudados, o licopeno apresenta-se como um carotenóide de cadeia longa, com 11 insaturações conjugadas e ausência de grupos terminais volumosos. Estas características permitem uma interação mais efetiva da CD com o respectivo caroteno, bem como, possibilita a formação da dupla encapsulação (justificada pelo grande deslocamento da banda ν_1).

A partir dessas características fica bem claro que o processo de complexação é possível, uma vez que as ciclodextrinas são inertes. Assim este processo esclarece como um carotenóide sofre influência do meio, o qual está inserido.

6. Perspectivas

Atualmente desenvolver trabalhos que envolvam produtos naturais, seja de qualquer natureza, é algo de interesse a toda uma comunidade científica, uma vez que estes podem estar relacionados com algum tipo de benefício a nossa saúde.

Já está mais que provado que os carotenóides combatem uma série de malefícios a saúde humana e neste sentido continuar a estudá-los, buscando outros pontos de vista, é de fundamental interesse.

Um novo trabalho relacionado com pigmentos naturais presentes em determinadas espécies de corais (KARAMPELAS, 2008) especificamente os octocorais *Chromonephthea braziliensis* e *Leptogorgia punicea* (Figura 4.14) característicos da costa sudeste brasileira, está sendo desenvolvido. Estudos preliminares indicam a presença de carotenóides nessas espécies além de sugerir a presença de polienos conjugados, uma nova classe de compostos denominados parrodienos (Stradi, 2001 e Veronelli *et al.* 1995). Parte deste trabalho está sendo realizado em parceria com o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), localizado no campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ.

Para este estudo e no intuito de complementar as informações para esta dissertação, técnicas de absorção como UV-Vis será utilizada, uma vez que as moléculas estudadas apresentam um sistema conjugado de elétrons π .

Estudos teóricos envolvendo o processo de microencapsulação com a β -CD também se encontra em andamento, além da possível utilização da γ -CD no processo experimental.

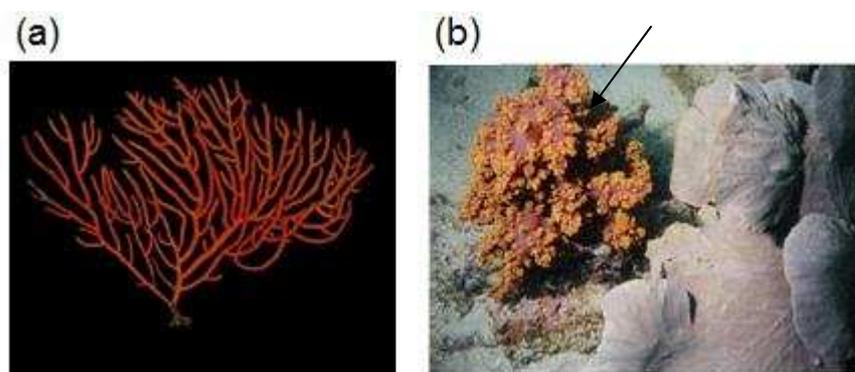


Figura 6.1. Imagens dos corais (a) *Leptogorgia punicea* b) *Chromonephthea braziliense* (KARAMPELAS, 2008).

7. Referências

ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C.; Carot. com atividade pró-vitamínica A de cenouras comercializadas em São Paulo. *Revista de Farmácia e Bioquímica* da USP de São Paulo, v.23; p. 133-141, 1987.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO M.D.V.C.; Carotenóides. In: Penteado, M.D.V.C.; *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. São Paulo-SP, p.3-52, 2003.

ALBRECHT, A.C.; TANG, J.; *Raman Spectroscopy; Theory and Practice* vol.2, Szymanski, H.A., ed.; Plenum Press, New York, p. 37, 1970.

ANDRADE, V.S., *Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)*, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

ARIKAN, S.; RODWAY, R.G, *Animal Reprod. Science*, v.641, p.49, 2000.

ATWOOD, J.L.; DAVIES, J.E.D.; MACNICOL, D.D.; VOGTLE, F., Eds.; Pergamon, 1996; p.3.

AZEVEDO-MELEIRO C.H.; Masters Thesis, Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, Brasil, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUES-AMAYA, D.B., *Food Compos. Anal.* v. 17; p. 385-396, 2004.

BANDARANAYAKE W.M., *Natural Product Reports*, v. 23, p.223-255, 2006.

BARANSKI, R, BARANSKA M, SCHULZ H. *Planta*; p.222; 448, 2005.

BARANSKA, M, SCHÜTZE W, SCHULZ H. *Anal. Chem.* v.78, p. 84-56, 2006.

- BARNARD, W., (Magister Scientiae) In The of Natural and Agricultural, University of Pretoria, August 2005.
- BERTOLUTI, M.D.; *Symmetry and Spectroscopy*, New York, Oxford University Press, 1978.
- BHASKARACHA, K, Rao DSS, DEOSTHALE YG, REDDY V. *Food Chem.* v.54, p. 189, 1995.
- BHALKAR, S. V.; DUBSH, D.J.; *Indian Journal of Dairy Science*; v.36(2), p.157-161, 1983.
- BHASKARACHA K., RAO, D.S.S; DEOSTHALE ,Y.G.; REDDY, V. *Food Chem.*; v.54, p.189, 1995.
- BLANCH G.P., DEL CASTILLO M.L.R, CAJÁ, M.M. PÉREZ-MÉNDEZ M., SÁNCHEZ-CORTÉS S., *Food Chem.* v.105, p.1335, 2007.
- BOAS, E.V.,CHITARRA A.B., CHITARRA M.I.F., Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.31(9), p.599-607, 1996.
- BRITTON, G.; *Structure and properties of carotenoids in relation to function.* V.9(15), p.155, 1995.
- BRITO, M.A.F.O.; NASCIMENTO, C.S.; SANTOS, H.F.; *Química Nova*, v.27(6); p.882-888, 2004.
- CABALLERO-ORTEGA H, PEREDA-MIRANDA R, ABDULLAEV, F.I. *Food Chem.* v.100; p.1126, 2007.
- CAMARGO, M.T.L.A.; *Medicina Popular: Aspectos Metodológicos para Pesquisa, Garrafada, Objeto de Pesquisa, Componentes Medicinais de Origem Vegetal, Animal e Mineral.* ALMED Editora e Livraria Ltda., **1985**, São Paulo, SP, Brasil.
- COSTA C.L.S.; CHAVES M.H.; *Quim. Nova*, v.28, p.149, 2005.

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.D.V.C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **2002**; v.22(3); p.224-228.

COLTHUP, N.B.; DALY, L.H.; WIBERLEY, S.E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3º edição, Academic Press, USA, **1990**.

CHEN J.P.; TAIB C.Y.; CHEN B.H.; *J. Chrom. A* **2004**; v1054; p.261.

CLARK, R.J.H.; HESTER, R.E.; (eds). *Spectroscopy of Advanced Materials*; **1991**; p.19.

DA SILVA C.E.; VANDENABEELE, P., EDWARDS H.G.M.; DE OLIVEIRA L.F.C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**; v.392; p.1489.

DAVIES, B.H. *Analysis of carotenoid pigments. In: Goodwin, T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Ed. Academic Press, London and New York. **1976**; v18; p.489-532.

DEL VALLE, E.M.M.; *Process Biochemistry*; **2004**, v.39; p.1033-1046.

DE OLIVEIRA, V.E.; CASTRO, H.V.; EDWARDS, H.G.M.; DE OLIVEIRA, L.F.C.; Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. *J. Raman Spectrosc.* **2010**, v.41, p.642–650

EUGSTER, C.H.; *History: 175 years of carotenoid chemistry. In: Britton, G., Pfander, H., Liaaen-jensen, S., v.1 A isolation and analysis*. Ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. **1995**; p.1-12.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M.; *Carotenoides, cores atraentes e ação biológica. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*; **2000**; v.13; p.40-45.

FRANCIS, F.J.; Handbook of food colorant patents. *Food and Nutrition Press* nc., USA; **1986**.

FRASER, P.D.; BRAMLEY P.M.. *Prog.Lipid. Res.* **2004**; v.43; p.228-265.

FROMMING, K.H.; SZEJTLI, J.; *Cyclodextrin in pharmacy*. Topics in inclusion science, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; **1994**.

GIL, M.I, TOMS-BARBERÁN F.A, HESS-PIERCE B, KADER AA. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; v.50; p.4976.

GOODWIN, T.W.; *The comparative biochemistry of carotenoids*. 1º Edição, **1952**

HAIYUN, D.; JIANBIN, C.; GUOMEI, Z.; SHAOMIN, S.; JINHAO, P.; *Spectrochim. Acta, Pat A*; **2003**; v.59; p.3421.

HOSANG, K., Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências dos alimentos do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, **2001**.

JACKSON, L.S., LEE, K.,LEBENS M.*Wiss. Technol.*, **1991**; v.24; p.289-297.

KARMPÉLAS F. E.S.; *Mar Biol* **2008** v.154, p.929–930.

KULL, D.; PFANDER H.; Appendix: List of new carotenoids. In vol. 1A: isolation and analysis, Britton G.; Lien-Jansen, S.; Pfander, H.; Birkhauser Verlag, **1995**; p.295-317.

KOYMA, Y.; TAKII, T. SAIKI, K.; TSUKIDA S.; *Photobiochem. Photobiophys.* **1983**; v.5; p.209.

KMIECIK, W, LISIEWSKA Z. *Food Chem.* **1999**; v.67, p. 61.

KIMURA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; *Food Chem.* **2002**; v.78, p.389.

KHACHIK F, BEECHER GR, LUSBY WR. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1989, 1465;
Rao A V, Agarwal S. *Nutr. Research* **1999**; v.19, p.305.

KANDLAKUNTA B, RAJENDRAN A, THINGNGANING L. *Food Chem.* **2008**;
v.106, p.85.

LAMCHARFI, E.; KUNESHCH, G.; MEYER, C.; ROBERT, B.; *Spectrochim. Acta
Part A*, **1995**; v.51, p.1861-1870.

LATSCHA, T.; “Carotenoids their nature and significance in animal feeds” Department
of Animal Nutrition and Health, F.Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland, **1990**.

LAKO J, TRENERRY C, WAHLQVIST M, WATTANAPENPAIBOON N,
SOTHEESWARAN S, PREMIER R. *Food Chem.* **2007**; v.101, p.1727.

LOFTSSON, T.; MASSON, M., BREWSTER, M.E., *J. Pharm. Sci.* **2004**; v.93, p.1091.

LEFSRUD, M.G, KOPSELL DA, KOPSELL DE, CURRAN-CELENTANO, J.
HortScience **2005**; v.40, p.2026.

MOURVAKI, E, GIZZI S, ROSSI R, RUFIni S. *J. Med Food* **2005**; v.8, p.104.

MÁRKUS F., DAOOD HG, KAPITÁNY J.; BIACS P.A.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**;
v.47; p. 100.

MERCADANTE, A.Z.; STECK ,A, PFANDER, H, BRITON G. *Phytochemistry* **1997**;
v.46; p.1379.

MERCADANTE, A.Z.; STECK A, PFANDER H, BRITON G. *Phytochemistry* **1999**;
v.52, p.135.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J.; Importância
nutricioanl de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericandos de
Nutrición*, **2004**; v.54(2), p.149-155.

MILANI, A.; TOMMASINI, M.; ZERBI, G.; *J. Raman Spectrosc.* **2009**; v.40, p.1931-1934.

MILLEN, R.P.; DE FARIA, D.L.A.; TEMPERINI, M.L.A.; *Química Nova*, **2005**; v.28(2), p.289.

MERLI, J.C.; *Pure & Appl. Chem.*, **1985**, v.57, p.785-792.

MORENO D.A, CARVAJAL M, L'ÓPEZ-BERENGUER C, GARCÍA-VIGUERA C.
J. Pharm. Biom. Analysis **2006**; v.41, p.1508.

NAKAMOTO, K.; *Infrared and Raman spectra of Inorganic and Coordination Compunds*, 4^oed. **1986**.

NASCIMENTO P.; MASTERS THESIS, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brazil, **2006**.

NICOLLAZZI, C.; ABDU, S.; COLLOMB, J.; MARSURA, A.; FINANCE, C.
Bioorg. Med. Chem. **2001**, v.9, p.275-282

OSLON, J.; A. Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **1999**; v.49(1); supl.1; p. 7-11.

OLIVEIRA, L.F.C.; DANTAS, S.O.; VELOZO, E.S.; SANTOS P.S.; RIBEIRO, M.C.C.; *J. Mol. Struct.* **1997**; v.435, p.101-107.

OLIVEIRA, L.F.C., Tese de Doutorado , Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **1991**.

PAPAVERO, N.; *Fundamentos Práticos de Taxonomia Zoológica*, 1^oed. **2006**.

PFANDER, H., *Key to Carotenoids*, 2nd ed., Basel: Birkhäuser Verlag, **1987**.

PSZCZOLA, D.E.; *Food Technologic.*, **1998**; v.52(6), p.70-82.

POPPLEWELL, L.M., BLACK, J.M., NORRIS, L.M., PORZIO, M., *Food Technol.*, **1995**; v.49, p.76-82.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; Extrato de Urucum. *Arquivos de biologia e tecnologia*, **1992**; v.35(1), p.63-74.

PLACZEK, G.; Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt, in Marx E.; *Handbuch of Radiologie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1934**; v.6, p.205.

PRESTON, H.D.; RICHARD, M.D.; *Food Chemistry*, **1980**; v.5(1), p. 47-56.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G.; *Química de alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia*. Editora Edgar Blucher, 1º edição, São Pulo, **2004**; p.155-157.

RODRIGUEZ-AMAYA D.B, KIMURA M, GODOY, H.T, AMAYA-FARFAN J. J. *Food Compos. Analysis* **2008**; v.21, p. 445.

RODRIGUES-AMAYA, D.B. *Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin a carotenoids in prepared, processed, and store foods*. Ed. John Snow, Inc/OMNI Project, **1997**; p.1-93.

RODRIGUES-AMAYA, D.B.; *A Guide to Carotenoid Analysis in Food* ed. ILSI Press, Washington DC, **2001**

REQUENA, A, CÉRON-CARRASCO JP, BASTIDA A, ZÚÑIGA J, MIGUEL B. J. *Phys. Chem. A* **2005**; v.109, p. 6852.

RÉ, M.J.; *Drying Techonologic*, **1998**; v.16 (6), p.1195-1236.

SALA, O.; *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*, 2º edição, São Paulo-SP Editora Unesp, **2008**.

SU, Q.; ROWLEY, K.G., BALAZS, N.D.H. *J. Chromatogr. B.*; **2002**; v.781, p.393-418.

SHAHIDI, F., HAN, X.Q., *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **1993**; 33(6), p. 501-547.

SCHIEDT, K., LIAAEN-JENSEN, S.; Isolation and analysis. In. Britton, G.; PFander, H; vol:1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland., **1995**; p.81-108.

SCHULZ, H, BARANSKA ,M, BARANSKI, R.; *Biopolymers* **2005**; v.77, p.212.

SÁ, M.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., *Food Chem.* **2003**; v.83, p.595.

SENTANIN M.A.; AMAYA D.B.R.; *Ciência Tecn. Alim.* **2007**; v.27, p.13.

STRADI, R.; PINI, E.; Celentano, G.; *Comparative Bioch. And Physiology Part B* **2001**;130, p.57-63.

SILVA, S.R, MERCADANTE A.Z.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2002**; v.22, p.254.

SZEJTLI, J.; *Chem. Ver.*; **1998**; v.98, p.1743-1753.

SENTANIN, M. A., AMAYA, D. B. R, *Ciência Techn. Alim.* **2007**, v.27, p.13.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas; **2001**; v.21(3), p.310-313.

TARANTILIS P.A.; TSOUPRAS, G, POLISSIOU M. *J. Chrom. A* **1995**; v.699, p.107.

TOMMASINI, S.; RANERI, D.; FICARRA, R.; CALABRO, M.L.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; *J. Pharm. Biomed. Analysis* **2004**; v.35, p.379.

TU, A.; *Raman spectroscopy in biology.* New York: John Wiley & Sons. **1982**.

- UENOJO, M.; JUNIOR, R.M.J.; PASTORE, G.M.; *Quimica Nova*, **2007**; v.30(3), p.616-622.
- VILLELA, G.G.; Pigmentos animais: Zoocromos. Editado pela academia Brasileira de letras de ciências ; **1976**; p.5-31.
- VILLERS, A.; *Acad. Sci. Paris*; **1991**; 112; 536.
- VINSON, J.A.; DABBAGH Y.A.; *Nutr. Research*. **1998**; v.18, p.1067.
- VILLELA, G.G.; Carotenoides. *In: Pigmentos animais.ed.Academia Brasileira de Ciências* **1976**; p.17-42.
- VERONELLI, M.; ZERBI, G.; STRADI, R.; *J.Raman Spectroscopy*; **1995**; v.26, p.683-692.
- VELU,C.S.; CZECZUGA, B.; MANUSWAMY.N., *Comp. Biochem. Phys. B.*; **2003**; v.135, p.35-42.
- ZACIALSKY PF; CLARK R.J.H, FAIRCLOUGH D.P. *Comp. Biochem. Phys.* **1983**; v.75B, p.169.
- WEESIE R.J.; MERLIN J.C; DE GROOT H.J.M.; BRITTON G, LUGTENBURG J, JANSEN F.J.H.M.; Cornard JP. *Biospec.* **1999**; v.5, p.358.
- WITHNALL, R. ; CHOWDHRY B.Z, SILVER J, EDWARDS H.G.M. ; de Oliveira LFC. *Spectrochim. Acta A* **2003**; v.59, p.2207-422.
- WEEDON, B.C.L., Chemistry of carotenoids. In. Goodwin,T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. ed. Academic Press, London and New York; p.73-123.
- YOUNG, A.J.; LOWE, G.M., *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, v.385, p.20-27.