

ANDRÉA GOMES DA SILVA

Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos de tomate
processado (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do
título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

ANDRÉA GOMES DA SILVA

Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos de tomate
processado (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do
título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 14 de Fevereiro de 2001

Prof. Afonso Mota Ramos
(Conselheiro)

Prof.^a Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)

Prof.^a Helena Maria Pinheiro
Sant’Anna

Prof.^a Valéria Paula Rodrigues Minim

Prof. Paulo César Stringheta
(Orientador)

Ao meu pai pelo incentivo à minha mãe sinônimo de força e dedicação.
Aos meus irmãos José, Maria, Neuza, Sebastião (in memorian), Rosimeire,
Valdir, Adriano, Eleilson, Vânia, Elza, Lúcia e Amilton.
Aos meus queridos e amados sobrinhos.
Dedico.

A minha doce e amada filha, Letícia
Ofereço.

Cada um tem o orientador que merece.
Ao Dr. Stringheta e Dr. Sabaa,
Agradeço.

AGRADECIMENTO

À Deus por ser meu guia.

Ao Prof. Paulo César Stringheta pela dedicação, amizade, orientação precisa e por acreditar no meu potencial.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade do aprimoramento acadêmico.

Ao Prof. Armando Sabaa Srur da UFRRJ/DTA por me iniciar no mundo científico, pela amizade, credibilidade e pelos constantes aconselhamentos e esclarecimentos.

Ao Prof. Fernando Pinheiro Reis pelos ensinamentos, esclarecimentos, pela dedicação e disponibilidade na condução da análise estatística deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem, Lígia Santana e Valério Poletto pela recepção e apoio constante na condução deste trabalho.

Aos orientados do Prof. Stringheta, pelo espírito de equipe, sobretudo Marcelo Fialho, Paulo César e Leonardo pela ajuda na condução de algumas análises.

Aos professores Afonso Mota Ramos e Tânia Toledo Teixeira pelos aconselhamentos, participação e irrestrita disponibilidade.

As professoras Valéria Paula R. Minim e Helena Maria P. Santana, pelas sugestões apresentadas.

Aos meus pais pelo amor e confiança. A minha irmã e amiga Vania por ser meu ouvido, meu conforto e estar ao meu lado em todos os momentos. Ao meu irmão Amilton pelo apoio. A minha irmã Elza por ser minha fã. A minha irmã Lúcia pelo incentivo e apoio maternal.

À secretária da pós-graduação, Maria Rita pelo seu pronto atendimento e ajuda. Aos funcionários da Fábrica, ao técnico Marco Aurélio, ao laboratorista Washington pela ajuda e atenção.

Ao Neto pela dedicação, apoio e incentivo.

À República “Garotas de Ipanema”, Flávia Araujo e Simone Taketa por ter se tornado parte da minha família. Ao meu grande amigo e agregado da república, Oscar Zambrana Morales pelo grato convívio e por me considerar sua família brasileira.

À Patrícia B. Lessa Constant, pela amizade, cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos. A Luciana Leal, que o próprio nome traduz a base da amizade. A estas duas pessoas por me acolherem tão carinhosamente.

Ao Dr. Carlos Domingos da UFF e sua família pela amizade e apoio irrestrito na condução deste trabalho.

À Pof^a. Valéria Tolentino da UFRRJ por ter me recebido em sua casa na chegada em Viçosa, pela amizade e apoio.

À Matilde e sua família pela receptividade na chegada em Viçosa.

Ser mãe...coisa que bem não se explica. A minha filha Letícia, fonte de inspiração e força.

Aos meus amigos africanos Pedro, Humberto, Fernando e Ludgero pelo suporte e amizade.

Ao meu inseparável amigo Pato Roco e minha prima Fabiana por estarem sempre juntos à mim nos melhores e piores momentos.

Aqueles que por ventura passaram 3 anos me ouvindo falar de LICOPENO ou aqueles que direta ou indiretamente tenham contribuído e não foram mencionados devido a EXAUSTÃO em que me encontro no PROCESSAMENTO desta dissertação, deixo um abraço APERTIZADO com a certeza de que será COLORIDO naturalmente.

BIOGRAFIA

ANDRÉA GOMES DA SILVA, filha de José Gomes da Silva e Djanira Alves de Oliveira Silva, nasceu em Campo Grande, Mato Grosso do Sul - Brasil, em 23 de março de 1973.

Em agosto de 1992, iniciou o curso de Economia Doméstica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, obtendo o título de Licenciada em Economia Doméstica em Outubro de 1996 e Bacharel em março de 1997.

Em Agosto de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O Tomate	3
2.2. Carotenóides	5
2.2.1. O licopeno: estrutura e propriedades.....	7
2.2.1.1. Isomeria	9
2.2.1.2. Extração.....	9
2.2.1.3. Degradação.....	11
2.2.1.4. Determinação de Carotenóides	14
2.3. A cor.....	14
CAPÍTULO I	
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES EXPRESSOS EM TEOR DE LICOPENO.....	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Local do Experimento	20
2.2. Matéria-prima	20
2.3. Processamento	20

2.3.1 Seleção e lavagem	20
2.3.2. Obtenção dos produtos derivados de tomate	21
2.3.2.1. Polpa de tomate	21
2.3.2.2. Tomate parcialmente desidratado	21
2.4. Análises dos produtos processados	22
2.5. Extração com solventes orgânicos	22
2.6. Determinação de carotenóides expressos em teor de licopeno	24
2.7. Análise estatística	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	33
CAPÍTULO II	
EFEITO DA TEMPERATURA E DA LUZ NA ESTABILIDADE DOS CAROTENÓIDES DO TOMATE.....	35
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Local do experimento	37
2.2. Estabilidade dos carotenóides	37
2.3. Análise estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1. Estudo da estabilidade dos carotenóides do tomate	40
3.1.1. Avaliação por espectrofotometria	40
3.1.2. Avaliação por colorimetria	49
3.1.2.1. Avaliação do efeito da temperatura	49
3.1.2.1.1. Temperatura de 40°C	48
3.1.2.1.2. Temperatura de 60°C	53
3.1.2.1.3. Temperatura de 80°C	57
3.1.2.2. Avaliação do efeito da luz	61
3.3. Correlação entre dados espectrofotométricos e colorimétricos	66
4. RESUMOS E CONCLUSÕES	69
CONCLUSÕES GERAIS	71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	80
APÊNDICE A	81
APÊNDICE B	82

RESUMO

SILVA, Andréa Gomes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2001. **Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos de tomate processado (*Lycopersicon esculentum* Mill).** Orientador: Paulo César Stringheta. Conselheiros: Afonso Mota Ramose Tânia Toledo de Oliveira.

A busca por pigmentos naturais para aplicação em alimentos e o desafio de sua produção industrial, tem motivado pesquisadores a investigar sua estabilidade ante a ação da luz, temperatura, pH e oxigênio. O licopeno, além de ser um eficiente antioxidante natural, é um corante que vem merecendo destaque. O tomate foi usado como fonte de licopeno, pois ele está presente em quantidades consideráveis, e representa 80-90% do total de carotenóides. A extração de licopeno foi investigada usando dois produtos de tomate (polpa de tomate e o tomate parcialmente desidratado) e seis solventes: acetona, hexano, etanol, acetona-hexano (7:3), hexano:etanol (1:1), acetona-hexano (1:1). As amostras foram trituradas com os solventes, utilizando-se 4 partes de cada solvente para uma parte de amostra. As misturas foram deixadas em maceração por 24 horas na ausência da luz e a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Após maceração, os extratos foram filtrados à vácuo e os resíduos reextraídos com a mesma relação amostra-solvente em mais duas etapas, com quatro repetições. O filtrado, de cada extração, foi separado por decantação e lavado com água destilada por quatro vezes. Em seguida, os extratos foram concentrados sobre pressão reduzida à $30-35^\circ\text{C}$ e recuperados com 10 mL de álcool etílico e 10 mL de hexano, para posterior leitura no comprimento de onda de máxima absorção a 472 nm. O licopeno foi quantificado utilizando $E_{1\text{cm}}^{1\%} =$

3450. A acetona foi o melhor solvente, porém, a capacidade extratora foi diferente para cada produto sendo a extração de licopeno melhor para a polpa de tomate. O etanol demonstrou menor poder extrator para ambos os produtos. Uma mistura de licopeno e óleo mineral foi preparada para estudar a foto e termossensibilidade do corante. Determinações espectrofotométricas e colorimétricas foram realizadas durante o período de estocagem. O efeito da luz foi o fator mais destrutivo do que a maior temperatura testada (80°C), sobretudo, pela descoloração brusca em algumas amostras, após 30 dias de estocagem. O pigmento foi pouco afetado quando armazenados no escuro, após 1488h, e em 40°C, após 2520 h. Obteve-se correlações significativas nas reduções dos valores lidos em absorbância com os valores colorimétricos “a⁺”, “b⁺” e “H”. Estas coordenadas foram as que melhor explicaram as variações ocorridas com o pigmento.

ABSTRACT

SILVA, Andréa Gomes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2001.
Extraction and estability of carotenoids gained from processed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Adviser: Paulo César Stringheta.
Committee Members: Afonso Mota Ramos and Tania Toledo de Oliveira.

The search of natural pigments for food application and the challenge of its industrial production has motivated researchers to investigate their stability under the influence of light, temperature, pH and oxygen. Lycopene, besides being an efficient natural antioxidant is a promising colorant. Tomato has been used as a source of lycopene because it is present in considerable quantities and represents 80 – 90% of total carotenoids. The lycopene extraction has been investigated using two tomato products (tomato pulp and partially dried tomato) and six solvents: acetone, hexane, ethanol, acetone-hexane (7:3), hexane-ethanol (1:1), acetone-hexane (1:1). The samples were grinded with solvent, using four parts of each solvent to one part of sample. The mixtures were left in maceration for 24 hours, without light and at room temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). After maceration the extracts were filtered in vacuum and the residues were re-extracted with the same relation between samples and solvents in two more stages, with four repetitions. The resulted filtered of each extraction was separated by decantation and washed four times with distilled water. Furthermore, the extracts were concentrated under reduced pressure at $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, and recovered with 10mL of ethylic alcohol and 10mL of hexane. The maximum absorption was determined at 472 nm. The lycopene were quantified using $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3450$. Acetone was the best solvent, but the efficiency of extraction

was different for each product and lycopene extraction was better for tomato pulp. Ethanol exhibited the lesser extracting power for both products. A mixture of lycopene and mineral oil was prepared to study the photo and thermal-sensibility of the colorants. Spectrophotometrical and colorimetrical determinations were done during the storage period. The effect of light was more destructive than the highest temperature tested (80°C), as was observed by the decolorization of some samples after 30 days of storage. Lycopene was little affected when stored in the dark after 1488 h, and at 40°C after 2520h. The loss of pigments observed by the reduction of absorbance values showed significant correlations with colorimetrical values “a⁺”, “b⁺” and “H”. These coordinates were the better explanation for the variation occurred with the pigment.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

A importância das cores na percepção pelos sentidos é marcante, sendo um dos critérios utilizados na identificação, aceitação ou rejeição de produtos alimentícios. Por isso, o homem há muito tempo vem utilizando pigmentos para colorir e/ou dar melhor aparência aos seus produtos. Quando os conhecimentos eram escassos, usavam vegetais ou minerais para colorir os produtos. Mais tarde, com a descoberta dos processos de extração de pigmentos dessas matérias-primas, passou a ser mais abrangente o uso dessas substâncias para a produção dos mesmos em escala industrial (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

Embora os corantes artificiais sejam, comprovadamente viáveis econômico e tecnologicamente, perdem no mais determinante aspecto, o mercadológico, onde atualmente a sociedade busca a utilização de produtos naturais em substituição crescente aos artificiais, por considerar mais saudável e menos prejudicial a saúde (CARVALHO, 1992). Vários fatores aliados a restrições legais, reduziram o número de corantes artificiais permitidos. Em contrapartida, viabilizaram o interesse de pesquisas em fontes, extração, estabilidade e rendimento de pigmentos naturais, não só para aplicação em alimentos, como também, na indústria farmacêutica, cosméticos, têxtil, papel e celulose, e o recente interesse de fabricantes de tintas para paredes, por este pigmento. Todo esse interesse não se reporta, apenas, ao fato da restrição ao uso dos corantes artificiais, mas pela potencialidade das características sensoriais, atividades biológicas e antioxidantes reveladas por essas substâncias (BARA e VANETTI, 1992; OLIVEIRA et al., 1997).

Na busca por uma “alimentação mais saudável”, discussões foram travadas a respeito da toxicidade de certos aditivos, sobretudo os corantes

artificiais. Em estudos toxicológicos a Organização Mundial de Saúde (OMS) cita algumas reações causadas pela ingestão de alguns corantes artificiais, dependendo do tipo e quantidade ingerida. Os efeitos mais passíveis de ocorrerem são disrritimias cardíacas, alergias, problemas gástricos e circulatórios, dentre outros (PIMENTEL, 1995).

As potenciais fontes de pigmentos naturais, em uso, são extraídas de plantas, animais, microorganismos e insetos, dos quais cita-se os corantes mais utilizados para alimentos são o carmim, betalaínas, cochonilha, antocianinas, clorofila, e os pigmentos do urucum (TAKAHASHI e YABIKU, 1992; OLIVEIRA et al., 1997).

O aumento da demanda na aplicação de pigmentos naturais em produtos alimentícios e o desafio de produzi-lo em escala industrial, salientou a procura de respostas tecnologicamente viáveis ao problema. Desta forma torna-se necessário a descoberta de fontes que possuam maior teor de pigmentos aplicáveis em produtos alimentícios, mais estáveis quanto a temperatura, luz e pH (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

O tomate é uma grande fonte de licopeno e sua viabilidade de utilização comercial para aplicação em alimentos o objeto deste estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O tomate

O tomateiro é originário da região que compreende do Norte do Chile ao Equador. Pertence a família das solanáceas. A planta é uma dicotiledônea de origem Tubiflorae, gênero *Lycopersicon*. A espécie cultivada é o *L. esculentum* e as demais usadas em programas de melhoramento. O fruto é carnosos, podendo apresentar coloração vermelha, amarela ou rosa. Até 1970, no Brasil, os tomates usados para fins industriais e para a mesa, eram do grupo Santa Cruz e tomate Caqui e Salada em menor quantidade. São requisitos de qualidade de tomates industriais: serem produtivos, de crescimento determinado, frutos com polpa vermelha e polpa de baixo pH. Desta forma introduziram-se cultivares próprios para a indústria. O tomate processado dá origem a diversos produtos consumidos no Brasil, como suco, purê, polpa concentrada, extrato, catchup, molhos culinários, tomate em pó e tomate seco (MINAMI e FONSECA, 1981).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de tomate, juntamente com os Estados Unidos, Itália, Grécia, Egito, Portugal. O estado de São Paulo é o maior produtor, seguido do cultivo no submédio do São Francisco Pernambuco e Bahia, expandindo-se, recentemente, para regiões do Estado de Minas Gerais e Goiás (GIL et al., 1987; MELO, 1993).

Basicamente, o mercado de derivados do tomate dividi-se em quatro categorias de produtos, sendo extrato de tomate, molho de tomate refogado,

purê de tomate e “catchup”. No entanto, o extrato de tomate é o mais representativo, participando com 49% do total. Existe uma tendência mercadológica na utilização de produtos que representam maior praticidade e rapidez na utilização; desta forma, molhos prontos são tendência na preferência de consumo (MELO, 1993). Por outro lado, a redução do gasto com matéria-prima reduz os custos refletindo positivamente nos lucros para a indústria. Esses fatores podem interferir, em última análise, na produção agrícola (MELO, 1993; VIGLIO, 1995).

Segundo MELO (1993), a produção de tomate para fins industriais no Brasil, ainda é, na sua maioria, baseada em cultivares de polinização aberta. Desde fins da década de 80, vem sendo ampliada a área cultivada com híbridos de origem californianas. Estes tomates possuem características ideais em termos de uniformidade, cor, consistência, forma, espessura da parede do fruto e menor índice de defeitos. Estes tomates possuem alto conteúdo de sólidos e maiores teores de licopeno.

O licopeno é encontrado em grandes concentrações, porém em restrito número de vegetais, sendo a maior quantidade encontrada no tomate, conteúdo que varia com a época da colheita e localização geográfica. Vários trabalhos reportam um superior conteúdo de licopeno em variedades de tomates híbridos, chegando a duas ou três vezes mais do que o tomate comum (Quadro 1). Está presente em outras frutas como goiaba, melancia, laranjas, pimentas verdes e, também, produzido em culturas de células (SAINI e SINGH, 1994).

Estudos realizados por SAINI e SINGH (1994), confirmam a superioridade no conteúdo de licopeno em cultivares híbridos, quando estudaram a composição de novas variedades de tomates híbridos, superando em teor de licopeno o híbrido usado como padrão e a cultivar não híbrida. Na indústria de processamento de tomate, um atributo de qualidade como a cor é de fundamental importância na aceitação do produto. Em análise de produtos finais para avaliar esses parâmetros, na prática, utilizam-se colorímetros dos mais simples aos mais sofisticados dos quais cita-se o colorímetro de Munsell, Macbeth-Munsell, Gardner e o modelo Hunter (MINAMI e FONSECA, 1981).

Quadro 1 – Distribuição de carotenóides em quatro cultivares de tomates vermelhos.

Carotenóides	Percentual do Total de Carotenóides			
	comum	Early redchief	Summer sunrise	New Yorker
Fitoeno	8,0	19,7	9,2	25,0
Fitoflueno	3,9	8,4	7,8	5,0
β -caroteno	14,3	2,3	6,9	5,7
ζ -caroteno	0,7	2,0	1,7	1,1
γ -caroteno	2,0	0,5	0,5	0,8
neurosporeno	0,6	0,4	0,1	0,2
licopeno	70,5	66,7	73,7	62,2
Total de carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1140,4	950	1700	922,0

Fonte: GROSS, 1991 [recalculado de Williams et al. (1967), coluna 2; Koskitalo e Ormond (1972), coluna 3; Raymundo et al. (1976), coluna 4; Lee e Robinson (1980), coluna 5.]

2.2. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos mais difundidos na natureza (GROSS, 1991). Conferem a coloração do amarelo ao vermelho, encontrando-se na fração insaponificável dos lipídios animais e vegetais, sendo responsáveis pela cor de frutas, flores, lagosta e outros crustáceos, alguns peixes e pássaros. Os carotenóides são sintetizados em plantas constituindo nessas a fonte animal (GROSS, 1991; AMAYA, 1982).

O nome dos carotenos deriva do maior representante do grupo, o β -caroteno. São hidrocarbonetos altamente insaturados, compostos de unidade

de isoprenos poliênicos formados por oito unidades de isoprenos (Figura 1). Apresentam formula geral $C_{40}H_{56}$, com ligação cabeça-cauda das 8 unidades de isoprenos, exceto no centro da molécula que as unidades são ligadas cauda-cauda, produzindo uma estrutura simétrica reversa no centro da molécula (GROSS, 1991; FIGUEIREDO, 1973).

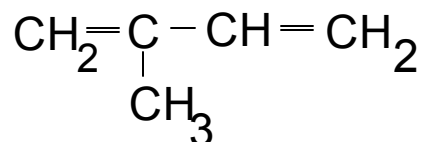


Figura 1 – Estrutura isoprênica (GROSS, 1991).

São classificados quimicamente em dois grupos: carotenos que possuem somente carbono e hidrogênio e os derivados oxigenados, sendo eles as xantofilas (monoois, diois e poliois), epóxidos, metoxilas, aldeídos, cetonas e ésteres (AMAYA et al., 1982). São, ainda, classificados como carotenos, acíclicos e alicíclicos, mono e bicíclicos.

Segundo GROSS (1991), os carotenóides são solúveis em lipídios e solventes orgânicos como a acetona, álcool, éter etílico, éter de petróleo, hexano e clorofórmio. Os carotenos apresentam melhor solubilidade em solventes mais apolares, porém as xantofilas são solúveis em solventes mais polares, como os álcoois. Absorvem luz na região do espectro ultravioleta (UV) e no ultravioleta-visível (UV-visível). O caráter estrutural responsável pela absorção de luz são os cromóforos, que são constituídos de uma cadeia de duplas ligações conjugadas. São necessárias pelo menos 7 duplas ligações para a percepção da cor.

São caracterizados pelo espectro de absorção eletrônica que apresentam. Absorvem, principalmente na região do azul (430-470 nm), e também absorvem nas regiões do espectro do azul-verde (470-500 nm) e verde (500-530 nm) e sua cor é caracterizada pela luz que refletem ou transmitem quando em solução (GROSS, 1991). Carotenos que possuem 7 duplas ligações, apresentam coloração amarelada, intensificando a tonalidade

de laranja para vermelho a medida que aumenta as duplas conjugadas na cadeia. Por outro lado, as duplas ligações presentes nos anéis não contribuem para a percepção da cor, como as presentes na cadeia (AMAYA et al., 1982).

Em alguns casos é necessário saponificar a amostra para a remoção de materiais indesejáveis ao processo, como lipídios, clorofilas e esteróis possivelmente presentes em alguns materiais. Pode-se empregar solventes ou misturas destes mais efetivos na extração, facilitando e diminuindo etapas de separação. (GRANADO et al., 1992; YAMANO et al., 1994).

2.2.1. O licopeno: estrutura e propriedades

Pesquisadores de várias partes do mundo vem buscando isolar, identificar, avaliar e quantificar componentes fitoquímicos em frutas e hortaliças na defesa do organismo contra doenças degenerativas. Muitos desses compostos receberam destaque, sendo largamente pesquisados, como o ácido ascórbico, os tocoferóis e β -caroteno. Por outro lado, outros fitoquímicos foram ignorados, provavelmente, por não serem considerados nutrientes, não os classificavam como vitaminas, nem como minerais. Porém, dentre os carotenóides, constatou-se que alguns destes fitoquímicos aumentam a resistência contra certas doenças. Esses carotenóides tem um importante aspecto no seqüestro de radicais livres, acreditando-se que desordens orgânicas e degenerativas, como por exemplo doenças cardiovasculares, catarata e câncer, estejam ligadas as reações dos radicais (NIR e HARTAL , 1996).

O oxigênio derivado dos radicais livres produzidos durante o metabolismo celular são compostos tóxicos, instáveis e muito reativos. Como os seres humanos não têm capacidade de sintetizar antioxidantes para a neutralização desses radicais, esta deve ser suprida pela ingestão de alimentos e/ou suplementos alimentares. O consumo de carotenóides varia com a dieta alimentar de cada indivíduo e a adição em formulações alimentícias tem sido comum na indústria, não apenas por ser um ingrediente, mas pelo papel importante na saúde humana. Provavelmente o interesse do β -caroteno para

essa finalidade tenha sucumbido o interesse por outros carotenóides (NIR e HARTAL, 1996).

O licopeno apresenta uma coloração do vermelho ao alaranjado. Não possui atividade pro-vitamínica como o β -caroteno, pois não apresenta em sua estrutura o anel β -ionona, responsável por esta característica (BOBBIO e BOBBIO, 1992; TAN, 1988). Tem uma única e longa cadeia molecular e estrutura contendo 13 duplas ligações, sendo 11 conjugadas (Figura 2). Essa configuração pode ser responsável por impedir a formação de radicais livres e o oxigênio singlete (NIR e HARTAL, 1996). Como a maioria dos pigmentos naturais, o licopeno é sensível a variações de temperatura, pH e luz (WISSGOTT e BORTLIK, 1996). É Solúvel em solventes orgânicos como a acetona, metanol, hexano, ou com a mistura destes para uma maior eficiência na extração.

O licopeno vem sendo pesquisado, sobretudo, para a aplicação em alimentos e nutracêuticos devido ao seu poder corante e seu efeito benéfico na saúde humana. Está presente no plasma humano em altas concentrações parecendo ser uma fração essencial ao organismo, agindo como uma via de defesa natural, atuando como agente anticarcinogênico, antioxidante e antimutagênico. Segundo NIR e HARTAL (1996), o licopeno foi mais efetivo antioxidante do que outros carotenóides testados. Em estudos mostrando a relação entre “ingestão” de carotenóides e o câncer, o licopeno apresentou resultados superiores aos outros carotenóides na inibição de certos tumores.

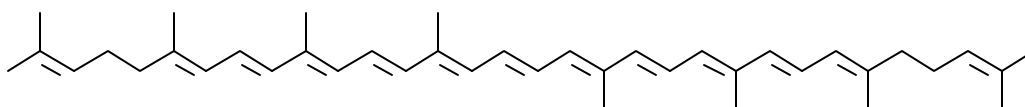


Figura 2 – Estrutura do licopeno (GROSS, 1991)

2.2.1.1. Isomeria

Todos os carotenóides exibem a isomerização *cis-trans* das ligações duplas, sendo mais comum apresentarem-se na forma *trans* pela sua maior estabilidade (BRITTON, 1996).

O número de possíveis estereoisômeros depende do número de duplas ligações na molécula. Teoricamente, são possíveis 1056 isômeros *cis-trans* para o licopeno, porém, apenas 72 são relatados (GROSS, 1991). Na natureza, existem pequenas quantidades de carotenóides com duplas *cis*. Estes diferenciam-se em potencial biológico e propriedades físicas (FIGUEIREDO, 1973). Quando sofrem tratamentos a altas temperaturas, sofrem isomerização para a forma *cis*; da mesma forma, ocorre em condições de pH baixo, acarretando diminuição da atividade pró-vitáminica e diminuição da cor (AMAYA et al., 1982).

2.2.1.2. Extração

Um método padrão de extração de carotenóides, é limitado pela diversidade do material biológico que os contenha. Antes da extração pode ser adicionado um antioxidante com o BHT ou o branqueamento de tecidos vegetais que contenham lipoxigenase, para evitar oxidação ou degradação enzimática. Em tecidos que contenham uma porcentagem alta de água a extração é facilitada com solventes orgânicos polares como a acetona, metanol, etanol ou a mistura destes são utilizados. Em amostras secas a extração pode ser procedida utilizando éter etílico ou éter de petróleo, com o auxílio de um triturador para facilitar a extração, sendo o procedimento repetido até que o resíduo fique incolor (GROSS, 1991).

A extração de pigmentos de fontes naturais, como o licopeno, é proporcionalmente influenciada pela natureza da amostra, afinidade com o solvente utilizado, as propriedades e a quantidade de corante a ser extraído. Pode-se extrair do material seco, utilizando solventes imiscíveis em água. No entanto, em amostras em estado natural, a extração costuma ser mais fácil, usando solventes miscíveis em água, como misturas de acetona e metanol e outros (GROSS, 1991; BRITTON, 1996). A mistura solvente-pigmento deve

sofrer agitação em temperatura que não ultrapasse os 40°C, aproximadamente, para obter uma elevada pureza e rendimento (HEIDRAS et al., 1997). Outros trabalhos reportam o uso do etanol na extração para identificação e quantificação de carotenóides (BIZRI e WAHEM, 1994; TAN, 1988). TORRICELA et al. (1994), empregou outro processo de solução extratora, em sucos de laranja, utilizando-se uma mistura de isopropanol-éter de petróleo.

MARTINEZ e DAMIDAUX (1993), estudando um rápido método de avaliação de clorofila e carotenóides contidos em folhas e frutos usou leitura em microplacas, em comparação com espectrofotômetros, sendo este, um método barato e rápido na quantificação de pigmentos, incluindo o licopeno. Utilizou-se tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados em casa de vegetação (dia 25°C e noite 18°C) usando diferentes genótipos derivados de inespecíficos cruzamentos com larga variabilidade no conteúdo de β -caroteno e licopeno. Os carotenóides da polpa do suco de tomate foram extraídos com acetona pura, em temperatura ambiente durante a noite e no extrato decantado foi adicionado uma alíquota de éter de petróleo. Ao extrato etéreo foi adicionado óleo mineral e, em seguida, o solvente foi evaporado a vácuo em temperatura ambiente.

Uma levedura convencional, *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizada para conferir uma nova via de biossíntese na produção de β -caroteno e licopeno. Ambos acumularam nas células dessa levedura sendo, considerado, o resultado do fluxo de carbono pela via biossintética de ergosterol que é parcialmente direcionado para a via de produção de carotenóides. Os pigmentos foram extraídos das células liofilizadas de *S. cerevisiae*, com acetona. O solvente foi evaporado por secagem e usou-se o extrato lipídico com posterior saponificação alcalina. A meta foi construir uma levedura que produzisse maior quantidade de carotenóides como β -caroteno e licopeno, útil como suplementos nutricionais ou corantes para alimentos. Isso deveria ser possível dirigindo a maior parte da via de ergosterol para a produção de carotenóides (YAMANO et al., 1994).

Um outro método utilizado na extração de pigmentos naturais tem sido o CO₂ supercrítico. Apresenta como vantagem sob a extração convencional de pigmentos, a baixa temperatura utilizada no processo de extração, juntamente

com a condição não oxidante, garantindo a integridade do produto final (ARAÚJO, 1995; DEGNAM et al., 1991).

2.2.1.3. Degradação

Davis (1949) e Wong e Bohart (1957), citados por AMAYA et al (1982), observaram um aumento de licopeno durante a estocagem de pasta de tomate e pó de suco de tomate desidratado á vácuo. Para explicar esta observação Miers et al. (1958) levantaram, pela primeira vez, a hipótese de reisomerização, ou seja, a transformação de *cis*-licopeno produzido durante processamento em *trans*-licopeno durante estocagem. Lovric et al. (1979) investigaram a isomerização de licopeno e a estabilidade da cor em tomate desidratado “foam-mat” durante armazenamento. Relataram, também, a restauração da cor perdida durante processamento por reisomerização na estocagem. BOSCOVIC (1979) apresentou um esquema dos prováveis caminhos na degradação do licopeno (Figura 3). Há isomerização térmica *trans-cis* do licopeno durante o cozimento, aquecimento e desidratação de alimentos. Durante a estocagem, o *cis*-licopeno poderia ser autoxidado irreversivelmente (2º estágio) ou reisomerizado para a forma *trans* (1º estágio). Estas duas reações são competitivas, mas cineticamente a reversão é mais lenta que a autooxidação. A passagem de mono-*cis*-licopeno para poli-*cis*-licopeno ou a passagem direta de *trans*-licopeno para poli-*cis*-licopeno foi incluída embora não tenha sido comprovada. A autooxidação, que é irreversível, apresenta como possíveis intermediários, derivados oxigenados com grupos hidroxilas e carbonilas, que são subsequente quebrados em fragmentos de baixo peso molecular, resultando assim em descoloração e desenvolvimento de odores estranhos.

Parece ser fator principal para os carotenóides a estreita relação entre sua estrutura com a estabilidade ,sendo escassos os trabalhos a respeito desse assunto. No processamento e armazenamento de suco de goiaba, AMAYA et al. (1982) relata um decréscimo de *trans*-licopeno com aumento de *cis*-licopeno, porém ambos decresceram durante a estocagem. O licopeno de cadeia acíclica sofre isomerização, mas não formam epóxidos durante o

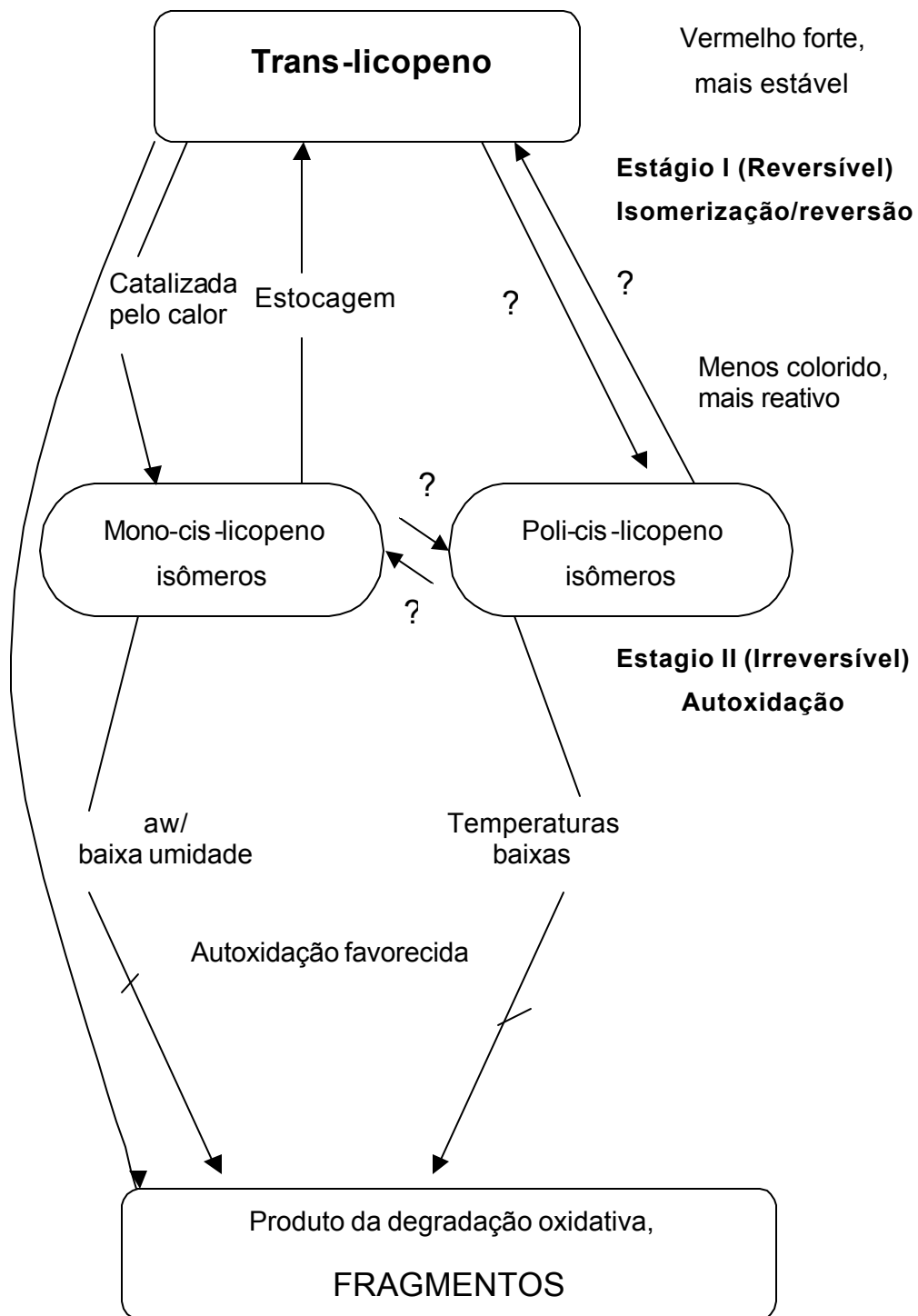


Figura 3 – Via de degradação de licopeno proposta por BOSCOVIC (1979). Caminhos não comprovados (?), ~~—~~

processamento e armazenamento. O contrário ocorre com o β -caroteno e criptoxantina que possuem cadeias alicíclicas.

Cole e Kapur (1957a), citado por BOSCOVIC (1979), acompanharam a perda de cor em polpa de tomate em função da disponibilidade de oxigênio, temperatura e intensidade de iluminação. O fator mais importante foi o primeiro, embora a elevação da temperatura e intensidade de luz aumentassem razoavelmente a descoloração. Ainda, os mesmos autores, estudaram a degradação de licopeno em solução de hexano e éter de petróleo, em presença de oxigênio e a influência da temperatura no processo. Perdas de 15 e 25% foram observadas durante 3 horas a 65 e 100°C, respectivamente, sendo que a presença de cobre favoreceu o aumento nas perdas de pigmento (COLE e KAPUR, 1957b).

BIZRI e WAHEM (1994), estudaram o efeito da acidificação e da adição de dimetil dicarbonato, de uma mistura de sorbato de potássio e benzoato de sódio e da temperatura de armazenamento com a estabilidade microbiológica e qualidade de suco de tomate. Foram utilizados 7 cultivares de tomate (Floridade, Sunny, Mountain Pride, Jet Star, Freedom, Ultrasweet e Carnival) produzidos na Estação de Agricultura Experimental de Oklahoma. O suco foi extraído e imediatamente medido o pH (4,5). Foi dividido em três porções (30 L cada). Dez litros de cada porção foi acidificada com ácido cítrico para pH 4,0, outra para pH 3,7 e uma foi o controle. Em outros 10 L foi colocado em igual quantidade uma mistura de sorbato de potássio e benzoato de sódio numa razão de 15% (m/v). Nos outros 10 L colocou-se dimetil dicarbonato. Cada tratamento foi armazenado nas temperaturas de 5°C e 20°C. Para avaliação da cor e da quantidade de pigmentos foram usadas medidas colorimétricas e espectrofotométricas, respectivamente. A adição de dimetil dicarbonato no suco acidificado ou não e armazenando a 5°C foram os meios mais efetivos no controle do crescimento microbiano (bactéria e fungo). Porém, o conteúdo de licopeno, β -caroteno, ácido ascórbico, aminoácidos totais, frutose e glicose diminuíram, além apresentar cores mais escuras, mais amarelas e menos vívida. Por outro lado, a redução de pH para 3,7, somado a mistura de sorbato de potássio e benzoato de sódio, e armazenando a 5°C ou 20°C foram muito efetivos, sobretudo, contra mofos e leveduras presentes em níveis muito baixos, mantendo ainda os fatores de qualidade.

2.2.1.4 – Determinação de carotenóides

Para análise de carotenóides pode-se utilizar cromatografia em coluna aberta ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O uso de espectrofotômetro e HPLC, a nível quantitativo é recomendável (HART e SCOTT, 1995). Medidas colorimétricas são empregadas na análise dos pigmentos presentes nas amostras, sobretudo onde a cor seja um padrão de qualidade e aceitação. Além de uma perfeita extração, identificação e quantificação, é necessária uma etapa de purificação do pigmento, bem como testes de estabilidade (em condições de laboratório) e a aplicabilidade no produto final. Em todos os procedimentos para obtenção dos pigmentos, deve-se tentar eliminar os pontos críticos das análises, como por exemplo os problemas passíveis de ocorrerem em análise por HPLC, ou seja, problemas relacionados ao solvente e a fase móvel injetados, as reações dos carotenóides com as superfícies metálicas do cromatógrafo, podendo alterar os resultados (HART e SCOTT, 1995; SCOTT, 1992). A adição de antioxidantes como o BHT, a cuidadosa escolha do óleo utilizado na diluição da oleoresina e o uso do nitrogênio faz-se necessário para minimizar perdas de carotenóides por oxidação. Facilmente afetados por calor, oxidação em presença de ar e exposição à luz, os carotenóides, devem receber cuidadosa manipulação. Uma forma de reduzir estas perdas é proteger as janelas do local de manuseio e não utilizar lâmpadas fluorescentes amarelas. (ARAÚJO, 1995).

2.3 – A cor

Os sentidos são responsáveis pela percepção do que ocorre ao seu redor, sendo o impacto visual marcante pelo aspecto, forma e, sobretudo pela cor dos objetos. Das percepções captadas pelo homem, 87% são pela visão, 9% pela audição e os 4% restantes, distribuído entre olfato, paladar e tato. A percepção visual da cor não limita-se a distinção da radiação luminosa de diferentes comprimentos de onda, principalmente as compreendidas entre 380 a 750 nm, mas, também, pelo estímulo captado pelo cérebro quando a luz

penetra em um artefato da visão. A cor e aroma conferem ao homem uma variada associação de idéias que estimulam o apetite. A expressão “comer com os olhos”, neste sentido, define bem a importância visual, pois são preferidos pelos consumidores produtos coloridos, com aspecto sadio e de coloração uniforme (PIMENTEL, 1995).

Para se definir e quantificar a cor uma série de conceitos físicos, químicos e matemáticos devem ser abordados, por isso a dificuldade do consenso, mas o fator contundente envolve a percepção da cor inerente a cada indivíduo. Quimicamente pode ser entendido como o resultado de uma reação que ocorre com a maioria das moléculas, gerando grupos que quando excitados eletronicamente, emitem radiação característica. Fisicamente é o fenômeno que se deve a absorção e reflexão de certos comprimentos de onda de luz incidente, por parte de um corpo e, ainda, “ser uma forma de expressão visual”, quando definida artisticamente (ESTUDO DAS CORES, 19--). Portanto, antes de todos os conceitos acima a cor deve ser considerada como sinais que entram no cérebro e vão produzir a interpretação, por este, do caráter da luz proveniente desses objetos na percepção do que se observa.

Instrumentos foram desenvolvidos para reproduzir a resposta das cores observadas pelo olho humano. São os sistemas de cores usados para descrevê-las em termos matemáticos, numa linguagem sistematizada e aceita universalmente, que, sem dúvida, contribui para uniformizar esse atributo tornando mais objetiva a aplicação industrial.

A percepção da cor é dependente de uma fonte de luz que pode se refletida, transmitida, absorvida ou refratada pelo objeto que está sendo iluminado. Se esta energia radiante é refletida por uma superfície opaca, o objeto é visto branco, e quando parcialmente absorvida o objeto é visto cinza. Quando a absorção é completa, o objeto é visto negro. Contudo, se a energia radiante é absorvida num comprimento de onda mais do que outro, a percepção pelos olhos fornece o que se chama de cor (CONSTANT, 1999).

Em síntese, a “Commission Internationale d’Eclairage” – CIE determinou um observador padrão que simula, numericamente, a visão. Sendo a visão tridimensional, a curva espectrofotométrica é especificada em termos de X, Y e Z. Simplistamente, pode ser entendido como X que relaciona-se com a cor vermelha, Y com a cor verde e com a luminosidade e Z com a cor azul. Vários

outros sistemas são conhecidos, mas todos os colorímetros de triestímulos baseiam-se no sistema CIE-XYZ. Outro sistema de cor instrumental é o L^* , a^* , b^* , desenvolvido por Judd e Hunter, conhecida como CIELAB (Figura 4). Neste sistema o L^* representa luminosidade; o valor a^* indicando o ponto do eixo vermelho (a^+) – verde (a^-) e o valor b^* , que relaciona-se ao ponto sobre o eixo amarelo (b^+) – azul (b^-) (CONSTANT, 1999, ESTUDO DAS CORES, 19--).

Foram adotados iluminantes padrões para a colorimetria, pela Comissão Internacional de Iluminação – CIE, em 1971, adotando-se a luz solar como iluminante padrão por excelência. A temperatura de cor corresponde a outra forma de descrever a fonte de luz, além das descritas em comprimento de ondas. A temperatura de cor refere-se a temperatura de um corpo negro ideal, que absorve a energia incidente sobre esta superfície e a reemite integralmente. O iluminante “A” corresponde a luz emitida por uma lâmpada incandescente (tungstênio) com temperatura de cor de 2857 K. O iluminante “B” corresponde a luz solar média do céu ao meio dia com temperatura de cor de 4870; e o iluminante “C” está relacionado a luz média diurna para um céu

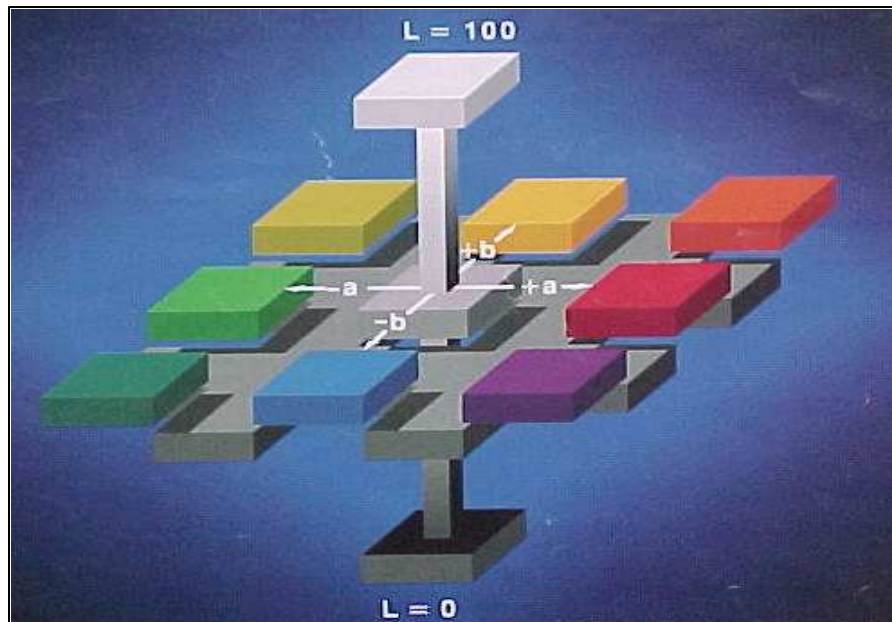


Figura 4 – Sólidos de Hunter (HUNTER LAB, 19--).

completamente coberto cuja temperatura de cor corresponde a 6770 K. Anos mais tarde foram determinados os iluminantes “D₅₀”, “D₆₀”, “D₆₅” e “D₇₅” com temperatura de cor que correspondem a 5000 K, 6000 K, 6500 K e 7500 K, respectivamente, correspondente a luz do dia (ESTUDO DAS CORES, 19-- , HUNTER LAB., 19--).

Por fim, a luminosidade é a qualidade que caracteriza o grau de claridade da cor que relaciona-se, quando iluminada por luz branca com constância na intensidade, as sensações produzidas pela superfície do objeto que apresenta essa coloração. A saturação ou cromaticidade da cor ou simplesmente “C” (chroma) é a qualidade que caracteriza a quantidade de cor, indicando os níveis em que está misturada com o branco, o preto ou o cinza. É dita saturada quando a cor não está misturada com outra acromática. A qualidade de uma cor pode ser analisada pela sua tonalidade ou matiz (H - Hue) que é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor, o que possibilita a diferenciação das cores. As cores obtidas por misturas não possuem tonalidade básica, sendo oportuno citar, que as cores se classificam em primárias, secundárias e terciárias. Apenas a primeira classificação é pertencente às cores que, quando misturadas, dão origem as demais, sendo elas o vermelho, amarelo e azul (ESTUDO DAS CORES, 19--).

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES EXPRESSOS EM TEOR DE LICOPENO

1. INTRODUÇÃO

É fato que a qualidade visual desperta sensações das mais diversas, sendo o impacto visual definido, sobretudo, pela cor. Devido às restrições na utilização de corantes sintéticos, a indústria de alimentos recorreu a uma série de pigmentos naturais, fato que desencadeou o aumento em pesquisas em fontes, extração e estabilidade de pigmentos naturais, bem como sua viabilidade econômica, legal e toxicológica (PIMENTEL, 1995).

O tomate e seus produtos são largamente utilizados na dieta alimentar, nas mais variadas formas e preparações (NGUYEN e SCHUWARTZ, 1999). O desenvolvimento de métodos de separação e identificação, tem mostrado que o licopeno é mais distribuído na natureza do que se pensava. O tomate é referenciado como excelente fonte de licopeno, pois esse encontra-se em maior quantidade, cerca de 80 a 90% dos carotenóides presentes, e com menor distribuição de outros carotenóides, sendo encontrado geralmente, ζ , γ , α e β -caroteno, neurosporene, fitoeno e fitoflueno (GROSS, 1991, TAN, 1988).

A extração deve ser procedida, o mais rápido possível para evitar perdas por oxidação ou degradação enzimática, com a utilização de solventes

orgânicos puros. O emprego de um antioxidante pode ser utilizado antes da extração dos carotenóides. Dependendo da natureza do material a ser extraído, emprega-se solventes miscíveis ou imiscíveis em água, que são triturados, filtrados e separados. Este procedimento é repetido até que o pigmento seja totalmente extraído (GROSS, 1991).

Devido a diversidade do material biológico que contém licopeno, é difícil estabelecer um método padrão de extração (GROSS, 1991). Esta dificuldade se estende, inclusive, para o mesmo material que sofreu diferentes processamentos. Estas diferenças levam a resultados discordantes e com baixa reprodutibilidade, sobretudo pela inexperiência do pesquisador (AMAYA et al., 1982).

A literatura é escassa em relação a métodos de extração de licopeno, sendo relatado vários processos de extração com solventes para identificação e quantificação utilizando espectrofotometria e cromatografia. No entanto, como são usados com o propósito acima mencionado não há a preocupação de extrair empregando-se solventes menos tóxicos e com menor gasto de solvente, viável num processo industrial. WISSGOTT e BORTLIK (1996), critica métodos que são inaplicáveis, largamente difundidos nas revistas especializadas, pois esbarram nos fatores econômicos, legais e exigências de segurança para uso em alimentos.

Com base no exposto, esse ensaio visou:

- Identificar a relação entre massa do tomate e volume de solução extratora viáveis no processo de obtenção do licopeno.
- Definir o melhor solvente e a forma da matéria-prima mais adequada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido na planta piloto de processamento de produtos de origem vegetal e no Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa - MG.

2.2. Matéria-prima

Foram utilizados tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv Santa Rosa no estágio de maturação próprio para processamento, como matéria-prima para o preparo de derivados, adquiridos no comércio do município de Viçosa – MG.

2.3. Processamento

2.3.1. Seleção e lavagem

A seleção dos frutos foi realizada manualmente, escolhendo-se os de coloração vermelha uniforme, eliminando-se aqueles com sinais de deterioração ou danos físicos. Em seguida, foram lavados por aspersão, para eliminar o excesso de matéria orgânica, e transferidos para tanques contendo

água clorada com 50 ppm (mg/L) de cloro residual total preparado à partir de hipoclorito de sódio, ajustando-se o pH para 6 com HCl 0,1N, onde ficaram imersos por 20 minutos, aproximadamente, sendo posteriormente lavados em água de enxágüe contendo 25 ppm (mg/L) de cloro livre.

2.3.2. Obtenção dos produtos derivados de tomate

Os tomates foram cortados manualmente com facas de aço inoxidável em quatro partes, no sentido longitudinal maior e ao meio, retirando-se as sementes e aparas, para o preparo do tomate parcialmente desidratado e polpa de tomate, respectivamente, usados como amostras para a extração de carotenóides.

2.3.2.1 – Polpa de tomate

Os tomates cortados ao meio foram despulpados, com auxílio de uma despulpadeira e concentrados em tacho encamisado à vapor em temperatura de 65-70°C até 19°Brix que foi medido com refratômetro de campo da marca PZO RR11. O extrato concentrado depois de frio, foi acondicionado em sacos plásticos de polietileno de alta densidade e armazenados a temperatura de – 20° C.

2.3.2.2 – Tomate parcialmente desidratado

Os tomates cortados no sentido longitudinal maior foram distribuídos uniformemente em bandejas e transferidas para um secador, onde o ar aquecido a 60°C era insuflado a uma velocidade de 1,9 m/s até que o teor de umidade atingisse em média de 66%, o que demorou aproximadamente 12 horas.

O produto parcialmente desidratado foi armazenado em embalagens plásticas de polietileno de alta densidade e armazenados a -20° C.

2.4 – Análises dos produtos processados

Os produtos obtidos foram analisados quanto à umidade, pH e acidez titulável, segundo metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

2.5. Extração com solventes orgânicos

Como solventes foram empregados a acetona, hexano, etanol e a mistura destes, nas seguintes proporções: acetona-hexano (7:3); hexano-etanol (1:1) e acetona-hexano (1:1). A extração foi realizada em três etapas (reextrações) partindo da mesma quantidade de amostra. Alíquotas de 5 g de amostra da polpa concentrada ou tomate parcialmente desidratado eram trituradas com solventes, utilizando-se 4 partes de cada solvente para uma parte de amostra, deixados em maceração por 24 horas em recipientes de vidro hermeticamente fechados ao abrigo da luz., à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Após maceração, os extratos foram filtrados à vácuo e os resíduos reextraídos com a mesma relação de amostra:solvente em mais duas etapas, com quatro repetições. O filtrado, de cada extração, foi separado em funil de decantação com éter de petróleo e lavados com água destilada por quatro vezes, com exceção do extrato hexânico, que foi lavado diretamente com água sem o uso do éter de petróleo. Posteriormente, os extratos etéreos e hexânico foram transferidos para balões de fundo redondo de 250 mL e concentrados sobre pressão reduzida à temperatura de $30-35^\circ\text{C}$. Em seguida, cada balão foi lavado com 10 mL de álcool etílico e 10 mL de hexano para posterior leitura de absorbância em 472 nm, obtidos da leitura no comprimento de onda entre 400 e 520 nm, em espectrofotômetro ultravioleta/visível modelo 2001U (GROSS, 1991). A Figura 1 apresenta o resumo do processo de extração do pigmento.

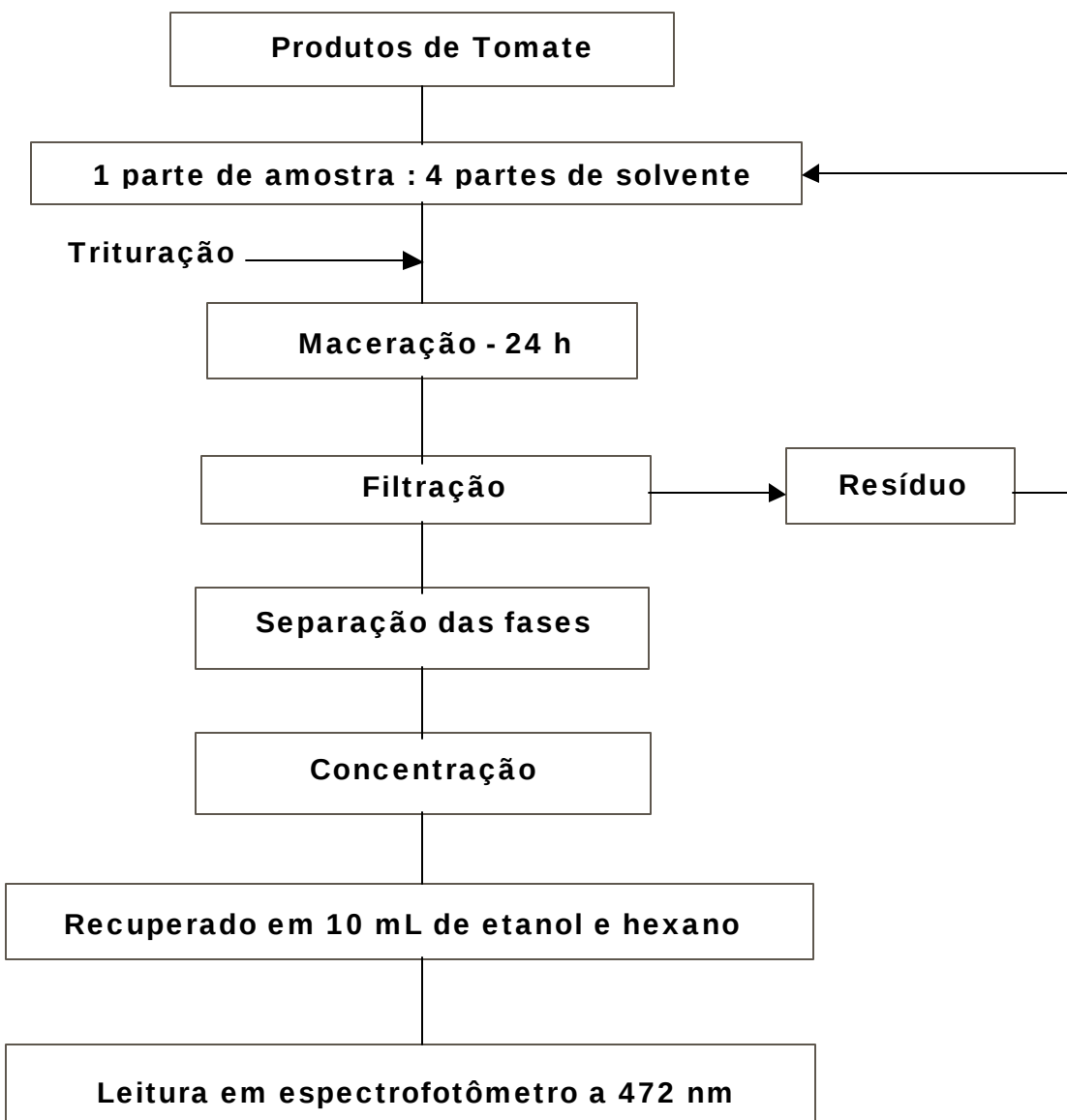


Figura 1 – Etapas do Processo de extração dos carotenóides obtidos dos produtos derivados de tomate.

2.6. Determinação do teor de licopeno expressos em carotenóides totais

Para determinação do teor de licopeno expresso em carotenóides totais, foram utilizadas medidas espectrofotométricas, com leitura no pico de máxima absorção a 472 nm lidos no espectro entre 400 e 520 nm, com valor de absortividade de $E_{1cm}^{1\%} = 3450$ (HART e SCOTT, 1995, TAN, 1988).

Os pigmentos extraídos do tomate não foram separados neste trabalho e será comum a menção ao licopeno, sem desconsiderar a contribuição dos outros pigmentos, pois a cor vermelha do tomate é atribuído ao seu principal caroteno, o licopeno, que constitui 80%, podendo chegar até 90%, do total de carotenóides do tomate. O restante é distribuído entre fitoeno e fitoflueno e em menor quantidade os pigmentos β -caroteno, ζ -caroteno, γ -caroteno e neurosporeno. Lembrando que o fitoeno e o fitoflueno estão presentes em quantidades apreciáveis, mas não contribuem para a percepção da cor. Então, pode-se considerar que a contribuição da cor se reporta ao conteúdo de licopeno, seguido do β -caroteno em ordem de importância por contribuir na coloração do tomate e seus produtos mas, sobretudo, por possuir atividade pró-vitâmica A (GROSS, 1991, TAN, 1988).

2.7. Análise estatística

Na análise da extração total utilizou-se o modelo fatorial 6x2 com seis solventes e dois derivados de tomate, com os tratamentos dispostos no delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Nas reextrações utilizou-se o modelo em parcelas subdivididas com 12 tratamentos nas parcelas, resultantes das combinações de seis solventes e dois derivados de tomate, dispostas no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As reextrações constituíram as subparcelas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 são apresentados os resultados das análises que foram realizadas nos produtos derivados do tomate processado que são a polpa concentrada e o tomate parcialmente desidratado. A acidez e o pH do tomate são de importância para a obtenção de produtos à partir dessa matéria-prima, principalmente na forma de polpa ou desidratado.

Inicialmente foram realizadas testes para definir o melhor solvente e a melhor forma da transformação do tomate para a extração do licopeno, não havendo na literatura dados de extração em maiores quantidades de licopeno para aplicação, apenas para identificação e quantificação.

Quadro 1 – Análises dos produtos derivados de tomate.

Determinações	Polpa concentrada	Tomate parcialmente desidratado
Acidez titulável (%)	1,82	1,9
Umidade (g 100g ⁻¹)	81,63	65,7
pH	4,31	4,32

* Valores médios

No Quadro 2 encontram-se os resultados do total de pigmento dos derivados do tomate obtidos nas três etapas de extração com os diferentes solventes . Constatou-se que o rendimento de extração foi diferente para os diversos solventes quando empregou-se os diferentes produtos de tomate. De modo geral, quando o tomate parcialmente desidratado foi utilizado, a quantidade de pigmentos extraídos foi maior do que quando foi usada a polpa de tomate, com exceção do solvente acetona. Este apresentou o maior rendimento de extração do que todos os outros solventes empregados. Foi observada uma diferença significativa entre a polpa de tomate e o tomate parcialmente desidratado. O hexano-etanol (1:1), pode ser considerado tão bom quanto à acetona em capacidade extratora, não apresentando diferença significativa entre as formas dos produtos de tomate empregados nesse estudo.

Para a polpa de tomate, a eficiência da soluções extratoras em ordem decrescente de extração foi a acetona, hexano-etanol (1:1) e acetona-hexano (7:3). As soluções de hexano, acetona-hexano (1:1) e etanol foram as que tiveram menor poder extrator, sendo a última o pior desempenho. Para tomate parcialmente desidratado, os solventes hexano-etanol (1:1), acetona e

Quadro 2 – Teores médios de licopeno expressos em carotenóides totais (mg 100g⁻¹) extraídos com os solventes (S1) acetona, (S2) hexano, (S3) etanol, (S4) acetona-hexano (7:3), (S5) hexano-etanol (1:1), (S6) acetona-hexano (1:1), utilizando a polpa de tomate (MPC) e o tomate parcialmente desidratado (MPD).

Matéria- prima	Solventes					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
MPC	14,598Aa	3,528Db	0,353Ea	6,857Ca	9,019Ba	4,416Db
MPD	10,409 Ab	6,967Ba	0,614Ca	7,524Ba	10,447Aa	9,286Aa

* As médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Newman Keuls a 5% de probabilidade.

acetona-hexano (1:1) apresentaram melhor poder de extração, seguidos do acetona-hexano (7:3) e hexano. Mais uma vez, o solvente etanol levou ao mais baixo desempenho de extração.

Nos Quadros 3 e 4, respectivamente, estão os resultados dos teores médios de licopeno, em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, expressos em carotenóides totais, e as porcentagens de cada etapa de extração. Os resultados evidenciaram as diferenças que ocorreram em cada etapa de extração, que variou conforme a o emprego dos derivados de tomate e solução extratora. Foi observado ao utilizar a acetona como solvente extrator em ambos derivados, um maior poder extrator ocorrendo na segunda etapa de extração com mais de 50% de pigmentos extraídos. Por outro lado, a terceira etapa de extração não pode ser desconsiderada, pois a primeira e a segunda extração somadas não chegaram a 90% de rendimento.

Quando foram usadas as combinações hexano+polpa de tomate e hexano+tomate parcialmente desidratado foram extraídos na primeira etapa cerca de 57,91 e 90,26% de licopeno, respectivamente (Quadro 4). Na segunda etapa de extração obteve-se de rendimento cerca de 95,08% para o licopeno extraído da polpa com hexano e 81,64% para a extração do licopeno do tomate parcialmente desidratado dos residuais de licopeno que permaneceram na amostra. Para as duas combinações de sistemas extratores descritas acima, o comportamento de extração não foi o mesmo. Para a polpa foi obtido menor rendimento e as duas primeiras etapas extraíram de forma semelhante, como pode ser observado no Quadro 3, consequentemente a maior parte dos pigmentos foi extraída nestas etapas. O contrário ocorreu com o tomate parcialmente desidratado, com menor rendimento de extração nas duas últimas etapas de extração, indicando que a maior parte do pigmento foi extraído na primeira etapa.

Quando o pigmento majoritário do tomate parcialmente desidratado foi extraído utilizado o hexano:etanol (1:1) e a acetona:hexano (1:1) o maior poder

Quadro 3 - Teores médios de licopeno expressos em carotenóides totais ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) em cada etapa de extração resultantes das combinações dos solventes (S1) acetona, (S2) hexano, (S3) etanol, (S4) acetona-hexano (7:3), (S5) hexano-etanol (1:1), (S6) acetona-hexano (1:1), com as amostras polpa concentrada (MPC) e tomate parcialmente desidratado (MPD).

Tratamento	Etapas de Extração			
	1	2	3	Total
S1+MPC	0,4758Cf	9,9643Aa	4,15Ba	14,598
S2+MPC	2,0433Ae	1,4808Ad	0,0765Bc	3,528
S3+MPC	0,1826Af	0,0371Ae	0,1333Ac	0,353
S4+MPC	0,8639Bf	1,0874Bd	4,9061Aa	6,857
S5+MPC	0,5087Bf	4,2547Ac	4,2558Aa	9,019
S6+MPC	1,4108Af	1,2117Ad	1,7936Ac	4,416
S1+MPD	3,4630Bd	5,4456Ab	1,5004Cb	10,409
S2+MPD	6,2890Ab	0,5543Be	0,1246Bc	6,967
S3+MPD	0,0108Af	0,2472Ae	0,3568Ac	0,614
S4+MPD	5,1434Ac	1,2973Bd	1,0840Bb	7,524
S5+MPD	8,0166Aa	1,9474Bd	0,4833Cc	10,447
S6+MPD	7,7774Aa	0,9126Bd	0,5961Bc	9,286

Dentro de uma mesma linha as médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Newman Keuls a 5% de probabilidade.

Dentro de uma mesma coluna as médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quadro 4 – Extração, em percentuais (%), em cada etapa de extração resultantes das combinações dos solventes (S1) acetona, (S2) hexano, (S3) etanol, (S4) acetona-hexano (7:3), (S5) hexano-etanol (1:1), (S6) acetona-hexano (1:1), com as amostras polpa concentrada (MPC) e tomate parcialmente desidratado (MPD).

Tratamento	Etapas de extração			Total
	1	2	3	
S1+MPC	3,26	68,26	28,48	100
S2+MPC	57,91	39,92	2,17	100
S3+MPC	51,73	10,50	37,77	100
S4+MPC	12,60	15,85	71,55	100
S5+MPC	5,64	47,17	47,19	100
S6+MPC	31,94	27,44	40,62	100
S1+MPD	33,27	52,32	14,41	100
S2+MPD	90,26	7,95	1,79	100
S3+MPD	1,76	40,21	58,03	100
S4+MPD	68,35	17,24	14,41	100
S5+MPD	76,73	18,64	4,63	100
S6+MPD	83,75	9,83	6,42	100

extrator ocorreu nas duas primeiras etapas, embora para o último solvente a extração na terceira etapa não tenha diferido significativamente da segunda. A extração do pigmento da polpa com acetona-hexano (1:1) comportou-se da mesma forma nas três reextrações, obtendo rendimento em torno de 50% menor que ao usar o tomate parcialmente desidratado. Ao empregar a polpa e o solvente hexano-etanol (1:1), o rendimento foi maior nas duas últimas etapas, porém com menor teor de pigmentos que os extraídos do tomate desidratado. Possivelmente, uma quarta etapa seria necessária para aumentar o teor de pigmentos obtidos, sobretudo dos que obtiveram melhor rendimento na terceira reextração.

O solvente acetona-hexano (7:3) obteve rendimento semelhante, não diferindo estatisticamente, para os dois derivados de tomate, mas foi diferente no comportamento de extração, sendo que para a polpa o maior poder extrator do solvente foi na terceira etapa.

As três etapas de extração comportaram-se da mesma forma quando utilizado o etanol como extrator para ambos produtos de tomate. Alguns trabalhos relatam a utilização de álcool etílico na extração de carotenóides para finalidade de identificação e separação dos carotenóides presentes, incluindo-se o licopeno. Embora esses trabalhos não revelem o volume nem o número de extrações, parece que são necessários grandes volumes de solventes e várias etapas de extração, observados nesse experimento, onde o etanol para ambos os produtos de tomate não apresentou boa performance e rendimento em relação aos demais solventes extratores. TAN (1988), estudou a preparação e análise cromatográfica de carotenóides em massa de tomate, relatando a utilização de 750 mL de etanol na extração de carotenóides de 150g de massa de tomate, para separação e identificação dos carotenóides presentes na amostra, encontrando quantidades de 254 ppm de licopeno, 167 ppm de fitoeno, 80 ppm de β -caroteno e 49 ppm de fitoflueno.

Além do fator rendimento, algumas considerações foram observadas durante a extração, que devem ser levadas em conta na escolha do solvente de acordo, com seu emprego. Quando foram usadas as soluções extratoras de etanol, acetona e acetona-hexano (7:3), foi observada a formação de emulsões na fase de transferência para éter de petróleo e lavagem com água destilada, possivelmente contribuindo para maiores perdas de pigmentos mais polares,

embora, TAN (1988), tenha analisado a fase polar do funil de separação e não constatou a presença de β -caroteno e licopeno, os dois principais carotenóides do tomate. Em contrapartida, quando se utilizou a solução de hexano e algumas de suas misturas, foi observada a formação de material gelatinoso ao triturar a amostra com o solvente citado, aderindo nas paredes dos recipientes e no triturador, o que contribuiu para perda de amostra, dificultando o cálculo de rendimento.

Os teores de licopeno obtidos são semelhantes aos encontrados por WILBERG e AMAYA (1993) que obtiveram amostras de extrato de tomate variando, em média, o conteúdo de licopeno de 5,34 a 10,6 mg 100g⁻¹. As variações entre os valores encontrados dos componentes do tomate podem ser atribuídas a época de colheita, variedade e tipo de solo cultivado. A variedade usada neste ensaio foi a de mesa, que possui teores mais baixos de licopeno do que a variedade utilizada para a indústria. Os mesmos autores utilizaram como solução extratora hexano-etanol (1:1), que foi um dos solventes que apresentou melhor poder extrator e uniformidade, observados nesse ensaio, conseguindo-se resultados semelhantes aos encontrados por WILBERG e AMAYA (1993), no que diz respeito a quantificação.

Com alguns cuidados durante a etapa de extração, como a utilização de um solvente convenientemente adequado ao uso final, cuidadosa manipulação durante todas as etapas de extração do pigmento e considerando as variações entre a mesma variedade, podem ser encontrados teores de licopeno semelhantes, mesmo que quantificados por técnicas diferentes. Este fato também foi mencionado por WILBERG e AMAYA (1993), quando procederam a quantificação de licopeno e β -caroteno em amostras procedentes de dois estados, usando métodos analíticos diferentes, chegaram a resultados concordantes.

SADLER et al. (1990), objetivaram avaliar o desenvolvimento de um método rápido e boa reprodutibilidade na extração de licopeno e β -caroteno de produtos de tomate e licopeno de frutas cítricas, utilizando o sistema extrator hexano-acetona-etanol (50:25:25). Os 100 mL do sistema extrator foram triturados com 4g de massa de tomate reconstituída e separada em duas fases, com a adição de 15 mL de água. A fase polar inferior continha acetona, etanol

e água. O licopeno que estava na parte superior junto com hexano foi injetado, sem nenhum procedimento adicional, para a análise cromatográfica. Foram encontrados valores médios de $15,8 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $8,7 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ de licopeno e β -caroteno em massa de tomate reconstituída, respectivamente.

Outro fator que, poderia ter influenciado no resultado desse trabalho, foi a tentativa de purificação do licopeno, pela lavagem do balão com 10 mL de álcool etílico e posterior lavagem com outros 10mL de hexano. O álcool etílico possivelmente extraiu outros carotenóides mais polares que o licopeno, promovendo possíveis perdas desse pigmento. No entanto, não foram observados picos característicos lidos em 472 nm pelo espectro de absorção feita com os 10 mL de álcool etílico. Pelas condições experimentais não foi possível identificar e quantificar, com maior precisão, os componentes que se solubilizaram no etanol, sendo recomendado estudos mais específicos da viabilidade do emprego desta técnica.

Nesse trabalho o objetivo maior foi qualificar o melhor solvente e os dois derivados do tomate empregados, por não ser encontrado na literatura, dados de extração de licopeno para aplicação em produtos alimentícios. A execução da extração em três etapas possibilitou o estudo do comportamento da extração quando variou-se os solventes e as amostras, mostrando que nas situações testadas uma quarta ou mais etapas de extração podem ser desejáveis para alcançar o máximo de pigmentos extraídos, dependendo da finalidade de utilização. Estes dados facilitam a tomada de decisão, do pesquisador, pela melhor combinação solvente+amostra, que satisfaça os propósitos finais de utilização, incluindo a viabilidade econômica, não elaborada neste trabalho.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A eficiência de extração é diretamente influenciada pelo estado da amostra e solventes empregados. Diferentes produtos e/ou seus derivados podem contribuir para diferenças na capacidade extratora do mesmo solvente, levando a resultados discordantes ou aumentando o volume da solução extratora, onerando o procedimento.

De modo geral, quando empregou-se o tomate parcialmente desidratado houve maior uniformidade no comportamento foi extraído maior quantidade de pigmentos quando comparada com a polpa.

A acetona foi o solvente que apresentou melhor capacidade extratora com maior rendimento. Porém o poder extrator foi menor quando empregou-se o tomate parcialmente desidratado.

Para o tomate parcialmente desidratado o hexano-etanol (1:1), a acetona e acetona-hexano (1:1), apresentaram a mesma capacidade extratora, com o melhor rendimento.

A solução extratora hexano-etanol (1:1) foi o segundo melhor solvente empregado na extração dos pigmentos de ambos derivados do tomate, mostrando-se versátil, na medida em que seu comportamento extrator foi semelhante na polpa e no tomate parcialmente desidratado.

O etanol foi o solvente que apresentou o pior desempenho na capacidade de extração do licopeno, para as condições testadas. Possivelmente, mais etapas de extração são necessárias para aumentar o poder extrator e, conseqüente, rendimento no conteúdo do licopeno.

As três etapas de extração possibilitaram o estudo do comportamento das mesmas quando variou-se os solventes e os derivados do tomate, mostrando que nas situações testadas mais etapas de extração podem ser desejáveis para alcançar o potencial máximo de pigmentos extraídos, principalmente daqueles que tiveram um rendimento considerável na terceira etapa. Esta metodologia facilitará a tomada de decisão pela melhor combinação solvente+amostra, que satisfaça os propósitos finais de utilização, incluindo a viabilidade econômica, não elaborada neste trabalho.

A lavagem do balão com álcool etílico, na tentativa de extrair carotenóides mais polares que o licopeno, não deve ser empregada até que se promova a identificação e quantificação dos componentes que se solubilizaram no álcool etílico.

CAPÍTULO II

EFEITO DA TEMPERATURA E DA LUZ NA ESTABILIDADE DOS CAROTENÓIDES DO TOMATE

1. INTRODUÇÃO

A cor constitui um dos fatores que influenciam a aceitabilidade do produto, determinando muitas vezes o processo decisório da compra.

O uso de carotenóides como corantes limita-se pela sua sensibilidade a fatores como exposição ao oxigênio, luz e temperatura, estabilizantes metálicos, aliado a sua limitada solubilidade a óleo e insolubilidade em água, além, de serem mais caros que os corantes artificiais (AMAYA et al., 1982, PIMENTEL, 1995). WISSGOTT e BORTLIK (1996), relatam que a literatura é rica em patentes e publicações científicas sobre a estabilidade de pigmentos naturais, porém, um questionamento crítico sobre estas publicações deve ser tecido, pois esbarram na inaplicabilidade devido a razões econômicas e requerimentos legais de utilização.

Segundo AMAYA et al. (1982), a aplicação de carotenóides em alimentos apresentam como vantagens a sua estabilidade na faixa de pH da maioria dos alimentos, não é afetado por substância redutoras como o ácido ascórbico, não corrosivo e alguns tem atividade de pró-vitamina A.

A estabilidade inferior dos corantes naturais, em detrimento aos artificiais, não é um fator que inviabilize sua utilização em produtos

alimentícios, face as adaptações no processamento e embalagem dos produtos, adotados pelas indústrias, na oferta de produtos coloridos naturalmente, atendendo a demanda dos consumidores na opção de utilização de produtos que se aproximem ao natural (CARVALHO, 1992, PIMENTEL, 1995). Com os avanços tecnológicos, a suscetibilidade à oxidação e a insolubilidade são problemas superáveis, porém são carentes de informações a respeito da sua toxicidade (AMAYA, et al., 1982, ARAÚJO, 1995).

As vitaminas são altamente pesquisadas, como é o caso do β -caroteno, mas outros carotenóides como o licopeno, foram ignorados, possivelmente por não apresentarem atividade pró-vitáminica A (NIR e HARTAL, 1996).

O tomate é a maior fonte de licopeno, sendo o conteúdo maior em tomates híbridos. Cerca de 90% do conteúdo de carotenóides no tomate é devido ao licopeno. Tomates e produtos de tomate, sobretudo na forma de extrato, têm sido usados para intensificar ou colorir diversas preparações culinárias, fazendo parte do consumo diário, em molhos para massas alimentícias, carnes e outros.

Vários trabalhos relatam a boa estabilidade do tomate ao processamento térmico e durante o armazenamento. Alguns relatam uma melhora da cor de tomates desidratados quando estes foram armazenados (MOLICA, 1999, NGUYEN e SCHWARTZ, 1999). Quando a ação do oxigênio sobre o pigmento é reduzida, o licopeno mostra maior sensibilidade à luz e ao incremento da temperatura.

Todos os trabalhos consultados reportam o estudo da estabilidade da cor do tomate em produtos normalmente consumidos. Face a demanda pelo consumo de produtos coloridos naturalmente e efeito benéfico a saúde, este trabalho objetivou:

- Avaliar a estabilidade de licopeno em relação à foto e termossensibilidade ao longo do tempo de armazenamento, em solução oleosa.
- Relacionar o comportamento qualitativo da cor com os dados quantitativos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa - MG.

2.2 - Estabilidade dos carotenóides

O licopeno extraído com acetona da polpa concentrada foi utilizado nos ensaios de estabilidade do pigmento em relação à temperatura e a luz, conforme metodologia adaptada por STRINGHETA (1991).

Foram preparadas soluções de licopeno em óleo mineral onde as leituras de absorbância inicial eram aproximadamente igual a 1,00. Essas soluções foram distribuídas em frascos incolores com capacidade de 60 mL que recebiam fluxo de nitrogênio, sendo imediatamente fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Os frascos ficaram expostos a 2.500 lux posicionados a uma distância de 9 cm de 2 lâmpadas fluorescentes de 40w, protegidos de qualquer outra fonte de luz, sendo a temperatura no ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Da mesma forma, foi testada a estabilidade na ausência de luz onde a solução foi acondicionada em frascos âmbar, fechados e protegidos de qualquer fonte luminosa e a mesma temperatura.

A estabilidade do extrato de licopeno foi determinada às temperaturas de 40, 60 e 80°C. As soluções eram acondicionadas do mesmo modo que no experimento na ausência de luz. As leituras das soluções de licopeno foram realizadas imediatamente após o resfriamento dos frascos, até a temperatura ambiente que era de 22°C.

Para todas as condições experimentais eram feitas leituras da mesma amostra no espectrofotômetro da marca HITACHI modelo 2001 e no colorímetro da marca Colorquest II do sistema HUNTER. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de máxima absorção à 480nm, obtida através do espectro de absorção de 400 a 650 nm, em espectrofotômetro ultravioleta/visível, utilizando-se como branco o óleo mineral. A leitura colorimétrica foi realizada por reflectância dos valores de “L” (luminosidade), “a⁺” (intensidade de vermelho) e “b⁺” (intensidade de amarelo). Os parâmetros croma ou saturação (C) e ângulo da tonalidade ou matiz (H) foram calculados pela relação dos valores de “a” e “b”.

As amostras foram lidas em três repetições com intervalo de 4 horas e seus múltiplos, estendida de acordo com o comportamento de degradação observados entre as duas últimas leituras.

O Quadro 1 resume os tempos de exposição do corante para as condições de armazenamento.

Quadro 1 – Avaliação da estabilidade do licopeno em diferentes condições de armazenamento.

Armazenamento	Duração (h)
Luz	1896
Escuro	1488
40°C	2520
60°C	2184
80°C	1080

2.3 Análise Estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As leituras ao longo do tempo constituíram os tratamentos, que foram estudados através de análise de regressão. Foram estimadas as correlações entre os valores de “L” (luminosidade), “a⁺” (intensidade de vermelho), “b⁺” (intensidade de amarelo), C (croma ou saturação) e H (tonalidade ou matiz) com os valores de absorbância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Estudo da estabilidade dos carotenóides do tomate

3.1.1 – Avaliação por espectrofotometria

Os pigmentos naturais são sensíveis a temperatura, luz, pH e oxigênio, interferindo na estabilidade dos mesmos. Isso tem incentivado inúmeros estudos visando detectar os limites de suscetibilidade a esses parâmetros que, se definidos, certamente contribuirão para a sua aplicação em produtos alimentícios, farmacêuticos e outros

Para melhor interpretação dos resultados são apresentados graficamente os dados referentes à estabilidade quanto à presença e ausência de luz e quanto às temperaturas testadas.

Quando se trabalhou com a temperatura de 80°C o tempo de 45 dias não foi suficiente para que chegasse a uma decomposição de 50%. O tempo da exposição do pigmento aos fatores de decomposição, foi definido pelo número de unidades experimentais disponíveis e não pela porcentagem de decomposição. Para as demais condições o tempo de análise foi fator insustentável, porque ao longo de 90 dias de experimento as reduções nos valores de absorbância não alcançaram 50%.

As primeiras 24 horas foi um período necessário à estabilização do pigmento. Nesse tempo, houve um ligeiro aumento na absorbância e nas coordenadas colorimétricas para todas as condições testadas. Este fato pode ser atribuído a adição do licopeno em óleo mineral, que por ser uma reação

orgânica, necessita de um determinado período para estabilização, que foi de 20-24 horas, quando se iniciou as leituras.

As curvas de degradação da solução de licopeno expostos à presença e ausência de luz são mostradas na Figura 1 e suas respectivas equações no Quadro 1. Os valores de K_d foram determinados pela inclinação da reta quando representado pelo $\ln$ da absorbância da solução de licopeno ao longo do tempo. A partir do K_d , determinou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da solução do pigmento, ou seja, tempo necessário para reduzir em 50% a absorbância inicial do pigmento, obtidos pela relação de $t_{1/2} = \ln 0,5/k_d$. Os valores de K_d e $t_{1/2}$ são mostrados no Quadro 2. Esses valores foram usados para estimar a estabilidade dos pigmentos expostos à ação da temperatura e da luz.

Pelos valores de k_d visualiza-se que há influência da exposição dos pigmentos à luz, ao longo do tempo, demonstrando que a K_d para esta condição foi mais elevada do que no escuro, determinando que a degradação do pigmento armazenado na luz foi superior ao escuro. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi estimado em 91 dias, para os frascos armazenados sob luz e 875 dias para aqueles armazenados no escuro (Quadro 2). Após 30 dias de exposição à luz, começaram a surgir frascos em posições aleatórias completamente translúcidos (incolores) ou com coloração amarelo pálida, fato que determinou o término do experimento, pois não havia amostras que apresentassem, visualmente, coloração. Esse fato, certamente influenciou no estudo da cinética de degradação da cor das soluções de licopeno, até um determinado período, a partir do qual, ocorreu brusca mudança de coloração.

No escuro, que serviu como controle, as soluções de licopeno demonstraram excelente estabilidade, sobretudo, pelo isolamento do efeito de luz e temperatura elevada, visto ser relatado na literatura que a exposição do pigmento à temperatura acima de 40°C contribui para as perdas de pigmentos (FIGUEIREDO, 1973).

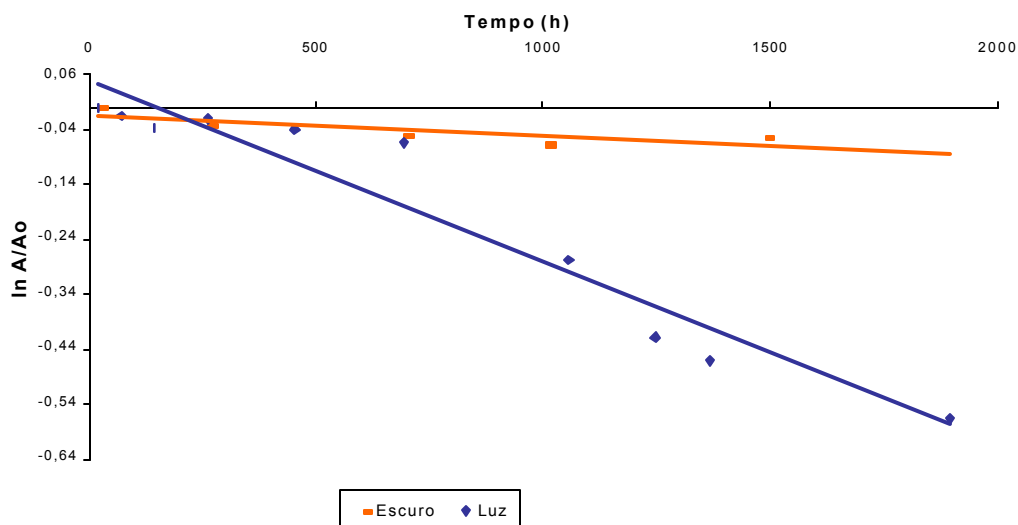


Figura 1 - Degradação de licopeno na presença e ausência de luz à temperatura ambiente ao longo do tempo.

Quadro 1 – Equações de regressão ajustadas para a relação ln da absorbância final e inicial A/A_0 e respectivos R^2 em função do tempo, em horas (t), da estabilidade na presença e ausência de luz, em temperatura ambiente.

Parâmetros	Equação da reta
Luz	$\ln = -0,000316^{**}t + 0,0471$ $R^2 = 0,86$
Escuro	$\ln = -0,000033^{*}t - 0,0155$ $R^2 = 0,66$

e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente

Quadro 2 – Valores de K_d e $t_{1/2}$ para presença e ausência de luz na temperatura ambiente.

Parâmetro	K_d	$t_{1/2}$ (dias)
Luz	0,000316	91
Escuro	0,000033	875

As curvas de degradação da solução de licopeno armazenadas a 60 e 80°C ao longo do tempo podem ser observados na Figura 2 e as equações de regressão estão apresentadas no Quadro 3. Da mesma forma, pode-se observar no Quadro 4 que quanto mais elevada a temperatura, maior é a constante de degradação, consequentemente menor é o tempo de meia-vida. A temperatura de 80°C apresentou maior degradação que 60 e 40°C, sendo o tempo de meia-vida estimado em 123 dias ou cerca de 4 meses. Para 60°C, o $t_{1/2}$ foi estimado em 177 dias, o que corresponde, aproximadamente a 6 meses.

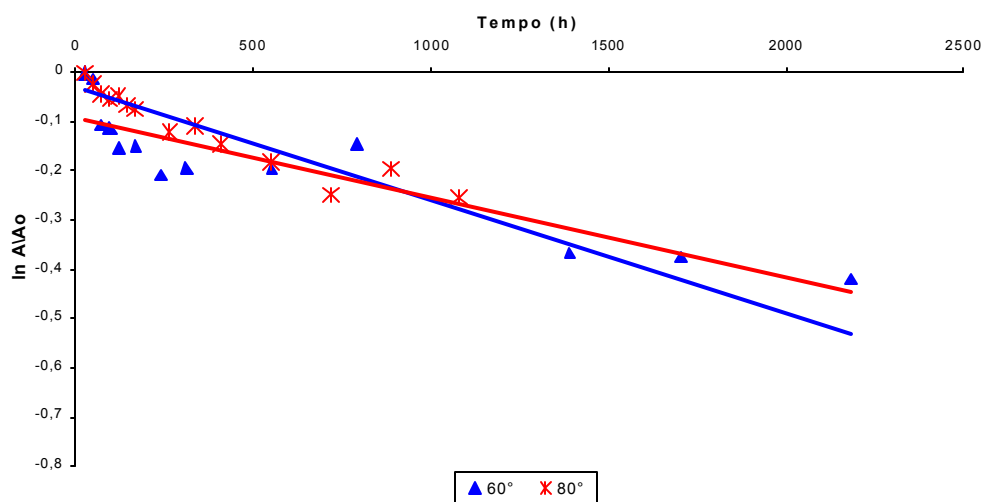


Figura 2 – Degradação de licopeno nas diferentes temperaturas ao longo do tempo, na ausência de luz.

Quadro 3 – Equações de regressão ajustadas para a relação $\ln$ da absorbância final e inicial A/A_0 e respectivos R^2 em função do tempo, em horas (t), da estabilidade a temperatura na ausência de luz.

Temperatura (°C)	Equação da reta
60	$\ln = -0,000163^{**}t - 0,0911$ $R^2 = 0,81$
80	$\ln = -0,000230^{**}t - 0,0301$ $R^2 = 0,90$

** significativo a 1%

Quadro 4 – Valores de K_d e $t_{1/2}$ para as temperaturas avaliadas, na ausência de luz.

Temperatura (°C)	K_d	$t_{1/2}$ (dias)
60	0,000163	177
80	0,000230	123

Na exposição do pigmento a 40°C houve pequenas variações nas reduções dos valores de absorbância ao longo do tempo avaliado. Pela análise de variância houve efeito de tempo significativo na degradação do licopeno ocasionado pela sensibilidade do teste, já que o erro experimental aproximou-se de zero. Porém, entre os modelos testados nenhum explicou satisfatoriamente as variações que ocorreram com o pigmento ao longo do tempo a 40°C. Esse fato não era esperado, principalmente se for considerado que o controle foi estocado a 20°C, ou seja, a metade da temperatura e ambos protegidos de qualquer fonte luminosa. Esse comportamento distinto para 40°C, também foi observado quando analisados por colorimetria. Para confirmar esses resultados foi realizada uma leitura 70 dias (1689 h) após o término do ensaio. As reduções nos valores de absorbância, neste período, atingiram nível de 5,4%. Não há relato na literatura sobre tal comportamento. Os valores das reduções da absorbância estão expostos na Figura 3.

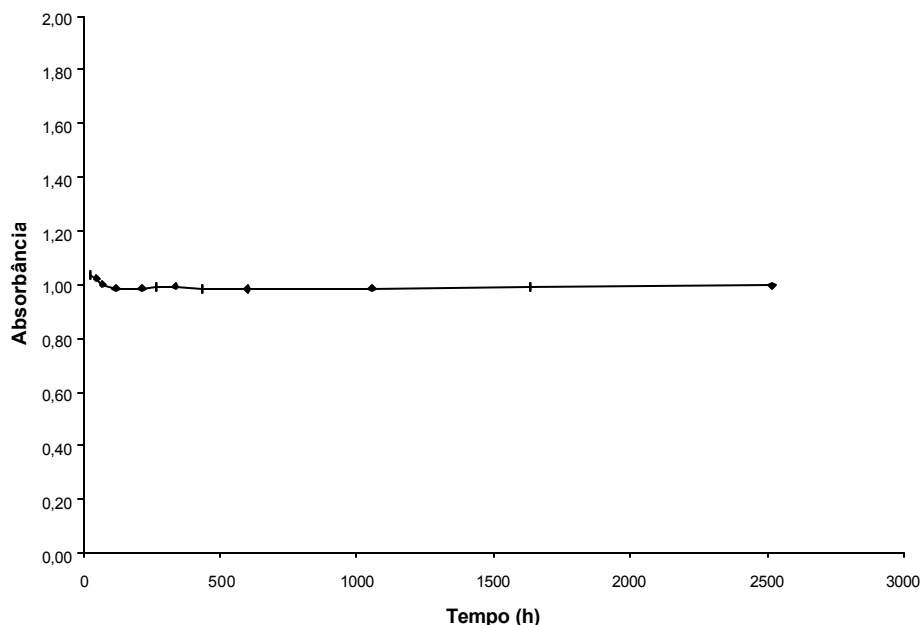


Figura 3 – Valores de absorbância da solução de licopeno ao longo do tempo para a temperatura de 40° C, na ausência de luz.

Ao comparar as duas condições mais aviltantes para o pigmento, foi constatado que o efeito da luz foi mais destrutivo do que a faixa de temperatura testada. Pelos resultados obtidos por CONSTANT (1999), trabalhando com outro carotenóide, observou que o efeito da luz foi mais destrutivo do que a temperatura de 75° C no estudo da estabilidade de bixina usada como controle (sem agente encapsulante), em pH 4.

Cole e Kapur (1957), citados por BOSCOVIC (1979), acompanharam a perda de cor em polpa de tomate em função da disponibilidade de oxigênio, temperatura e intensidade de iluminação. Constatam que o maior contribuinte para a degradação foi a oxidação, embora os dois últimos tenham contribuído para a descoloração.

NOBEL (1975) investigou o efeito da temperatura na mudança de cor em polpa de tomate com 10, 15 e 20% de sólidos solúveis, concentrados à vácuo em temperatura de 46 ± 1 °C. Foram preparados sucos reconstituídos da polpa concentrada em 5% de sólidos solúveis e uma polpa não concentrada, como controle processada a 121°C por 42 segundos. Foram perceptíveis as

mudanças na cor dos sucos da polpa concentrada, ao comparar com o controle. O controle foi escolhido como o suco mais vermelho e o suco proveniente da polpa com 20% de sólidos o menos vermelho, pelos painelistas. As pastas com 10, 15 e 20% de sólidos, sofreram perdas de 12, 20 e 36% do total de pigmentos e 11, 22 e 57% de licopeno, respectivamente. O decréscimo do conteúdo de licopeno foi devido a uma degradação real de licopeno, na conversão progressiva de *all-trans*-licopeno para forma *cis*, que é menos colorida.

A mesma explicação na degradação foi reportada por SUDHAKAR e MAINI (1994), quando estudaram a estabilidade de carotenóides totais, expressos em β -caroteno, durante a estocagem de polpa de manga. As perdas de carotenóides foram de 5,1 e 10,5%, em média em pH de 2,5, 3,5 e 4,0, depois de dois e quatro meses de estocagem, respectivamente. Em contraste, as perdas médias foram de 10,6 e 15,2% em pH 4,5 e 5,0 no mesmo período. Um gradual decréscimo nos carotenóides foi observado independente do pH inicial. Embora, essa diferença tenha sido notada, a cor da polpa permaneceu amarelo brilhante em pH 2,5 e 3,0 quando comparada com os valores de pH mais altos que são de 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0. Isto pode ser atribuído a isomerização de *trans*-carotenóides para a menos colorida forma *cis* em virtude do aumento no pH. Houve diferença para os diversos envases, sendo o máximo de retenção dos carotenóides alcançados quando usou-se recipientes de vidro estocados a 2° C (mais de 90%) e a menor retenção a 40° C (cerca de 80%), no mesmo recipiente. Em embalagens plásticas, a taxa de degradação é aumentada devido a permeabilidade ao oxigênio.

Davis (1949) e Wong e Bohart (1957), citados por AMAYA et al. (1982), observaram um aumento de licopeno durante a estocagem de pasta de tomate e pó de suco de tomate desidratado à vácuo. No mesmo sentido, LOVRIC et al. (1979), observaram a estabilidade da cor em tomate desidratado “fom-mat” durante armazenamento, e reportaram que a restauração da cor perdida durante processamento foi atribuída a re-isomerização de licopeno na estocagem.

Com base nestas observações, BOSCOVIC (1979), apresentou um esquema dos prováveis caminhos na degradação do licopeno e relacionou com

mecanismos de isomerização térmica *trans-cis* do licopeno durante o processamento. No entanto, durante a estocagem, o *cis*-licopeno poderia ser autoxidado irreversivelmente ou reisomerizado para a forma *trans*. Estas duas reações são competitivas, mas cineticamente a reversão é mais lenta que a autooxidação de *cis* isômeros.

A retenção de corantes lipossolúveis parece ser resultante da interrelação entre autooxidação e isomerização e a importância da competição entre essas duas rotas que envolve a isomeria (BOSCOVIC, 1979).

Deste modo, as observações dos pesquisadores, a respeito das reações de isomerização que envolve o licopeno, podem ser relacionados com a relativa estabilidade das condições mais brandas de armazenagem $\pm 40^{\circ}\text{C}$ e no escuro (estocado a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O vigor das demais condições de armazenagem potencializou o efeito da autooxidação, sobretudo, pela exposição do pigmento ante a ação da luz.

Parece ser fator principal, para os carotenóides, a estreita relação entre sua estrutura com a estabilidade, sendo escassos os trabalhos a respeito desse assunto. No processamento e armazenamento de suco de goiaba, AMAYA et al. (1982), relatam um decréscimo de *trans*-licopeno com aumento de *cis*-licopeno, porém ambos decresceram durante a estocagem. O licopeno de cadeia acíclica sofre isomerização, mas não forma epóxidos durante o processamento e armazenamento. O contrário ocorre com o β -caroteno e criptoxantina que possuem cadeias alicíclicas.

Alguns autores relatam a melhor absorção de licopeno em produtos de tomate processados termicamente do que aqueles consumidos “in natura”. O principal contribuinte para a concentração total de licopeno no plasma é a forma all-*trans*, porém ao comparar a proporção dos isômeros *trans:cis* sugere-se que a forma *cis* é absorvida mais eficientemente do que a *trans* (STAHL e SIES; 1992, PORRINI et al., 1998; BOILEAU et al, 1999).

Os resultados mostraram que após 30 dias de armazenamento começaram a surgir frascos em posições aleatórias completamente translúcidos (incolores) ou com coloração amarela pálida na exposição do pigmento a luz. Fato que determinou o término do experimento, pois não havia amostras que apresentassem, visualmente, coloração. Esse fator, certamente

poderá ter influência no estudo da cinética de degradação da cor das soluções de licopeno, até um determinado período, à partir do qual, ocorreu brusca mudança de coloração. Possivelmente, este fato está ligado a passagem de *trans*-licopeno, mais estável, para a forma mono ou poli-*cis*-licopeno que são menos estáveis e mais reativos (BOSCOVIC, 1979).

O licopeno apresentou problemas de solubilidade, fato que dificultou a escolha de um diluente para o estudo da estabilidade. Este pigmento apresenta melhor solubilidade em solventes orgânicos menos polares e em soluções oleosas. O uso de um óleo vegetal poderia superestimar (ou potencializar) a degradação uma vez que são mais suscetíveis a degradação por serem insaturados, apesar da vantagem de estar pronto para aplicação. O propileno glicol também foi testado, porém não obteve-se resultados satisfatórios. O óleo mineral por ser uma base inerte foi um excelente diluente para os pigmentos extraídos do tomate no estudo da foto e termossensibilidade. O óleo mineral é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos obtidos a partir do petróleo. Este óleo é indigerível e absorvido somente em grau limitado. Quando tomado por 2 a 3 dias, penetra e amolece as fezes e pode também interferir na absorção de água. Os efeitos adversos que podem resultar do uso de óleo mineral com laxante, apoiam sua contra-indicação. Estes incluem a interferência na absorção de substâncias lipossolúveis essenciais, a estimulação de reações de corpo estranho na mucosa intestinal e outros tecidos e extravasamento da pasta oleosa pelo esfíncter anal (GILMAN, 1991). Por outro lado, este óleo exibe ação fisiológica em virtude de sua ação emoliente para a pele, sendo utilizado em várias formulações pelas indústrias de cosméticos (BARBOSA, 1998). Desta forma o óleo mineral, foi utilizado por apresentar características interessantes e próprias para a solubilização do licopeno.

3.1.2 – Avaliação por colorimetria

3.1.2.1 Avaliação do efeito da temperatura

3.1.2.1.1. Temperatura de 40 °C

As alterações qualitativas sofridas por esse pigmento nesta temperatura foram muito suaves, mostrando um comportamento distinto das demais condições avaliadas.

O comportamento da coordenada “a” sofreu tendência de redução nos seus valores, como pode ser observado na Figura 4. Observa-se que a cor da solução de licopeno em óleo mineral, modificou-se ao longo do tempo indicando que a contribuição do vermelho está se reduzindo. Alguns autores, indicam que a coordenada “a” apresenta boa correlação com o conteúdo de pigmentos vermelhos (NOBLE, 1975, THIAGU et al., 1993). CONSTANT (1999), considerou ser a coordenada “a” a que melhor representa a degradação sofrida pela bixina microencapsulada, ao longo do tempo.

Para a luminosidade (L) e a coordenada “b” (intensidade do amarelo), não foram ajustados nenhum modelo de regressão satisfatório para explicar as variações ao longo do tempo. Os valores observados da luminosidade (L) e “b” estão expostos na Figura 5 A e 5 B, respectivamente, onde pode-se verificar que os valores da luminosidade (L), após 48 h, reduziram de $48,10 \pm 0,2$ para $46,7 \pm 0,2$, permanecendo nesta faixa até o fim do experimento. Um decréscimo nos valores da luminosidade (L) é observado a medida que incrementa a severidade do tratamento térmico em produtos de tomate (NOBLE, 1975). Porém, em tomates desidratados, durante estocagem, houve tendência de aumento no valor “L” e da mesma forma com “a” e “b” (MOLICA, 1999).

Praticamente, não houve variação nos valores de “b” que foram de $25,5 \pm 0,2$, podendo-se admitir que este fato relaciona-se com a isomerização para a forma *cis*. Porém admitindo-se a hipótese de reisomerização, as reações de autooxidação e reversão são competitivas e se a forma *trans* (mais estável) degrada, a forma *cis* (mais reativa) também o faz (BOSCOVIC, 1979).

Para o croma (C) ou saturação da cor houve tendência de declínio suave para esta temperatura, facilitando a percepção da mudança na matiz (Figura 6 A) e, observa-se uma tendência de aumento na tonalidade (H) (Figura 6 B). O comportamento desses dois parâmetros, indicam que mudanças ocorreram na cor das soluções de licopeno armazenadas a 40°C ao longo do tempo e, consequentemente, no conteúdo do mesmo.

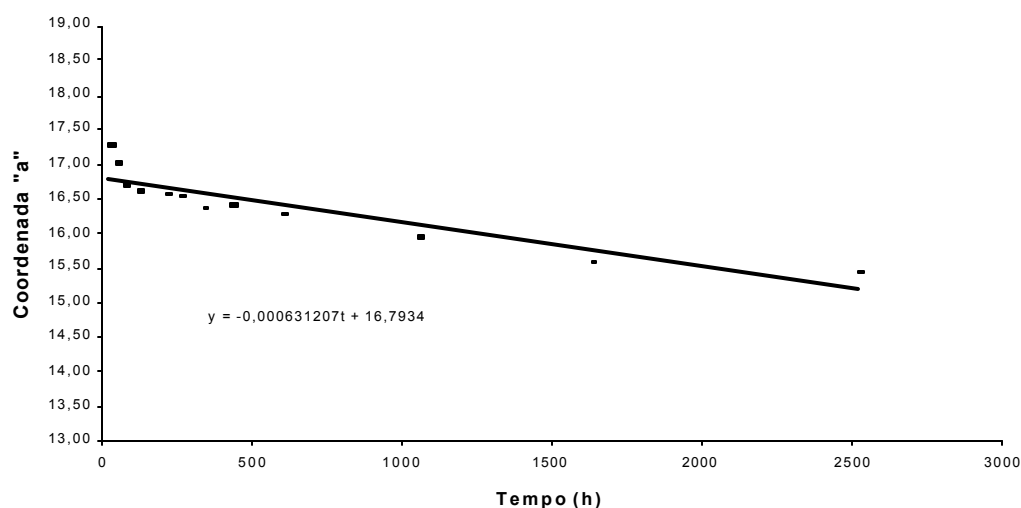


Figura 4 – Comportamento da coordenada “a” (intensidade do vermelho) ao longo do tempo, armazenado a 40°C na ausência de luz.

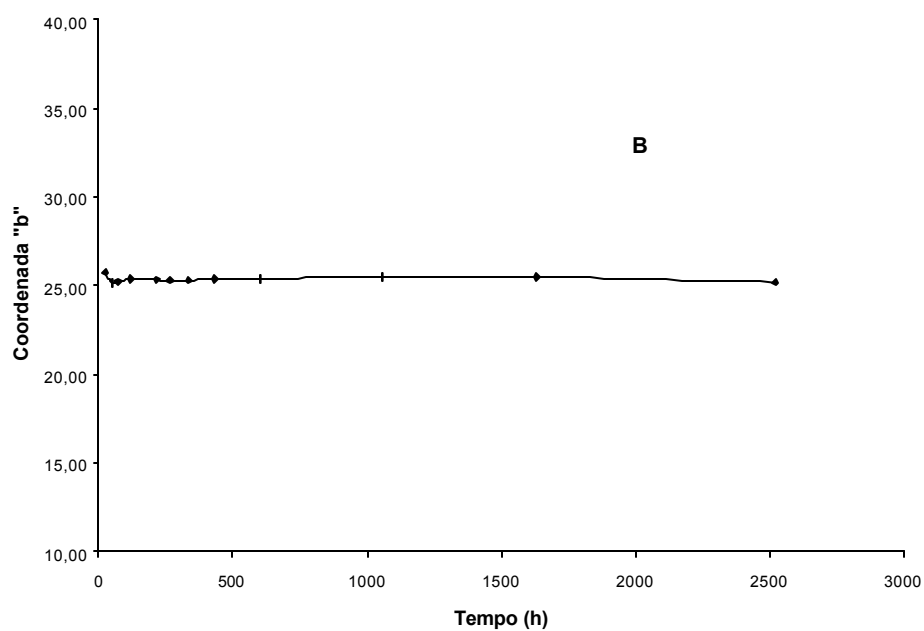
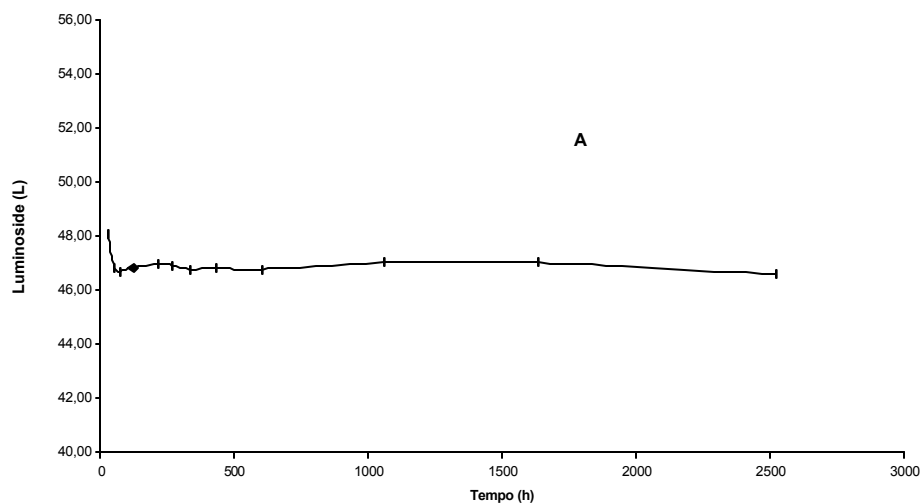


Figura 5 – Valores da luminosidade (L) e da coordenadas “b” (intensidade do amarelo) ao longo do tempo, armazenado a 40°C na ausência de luz.

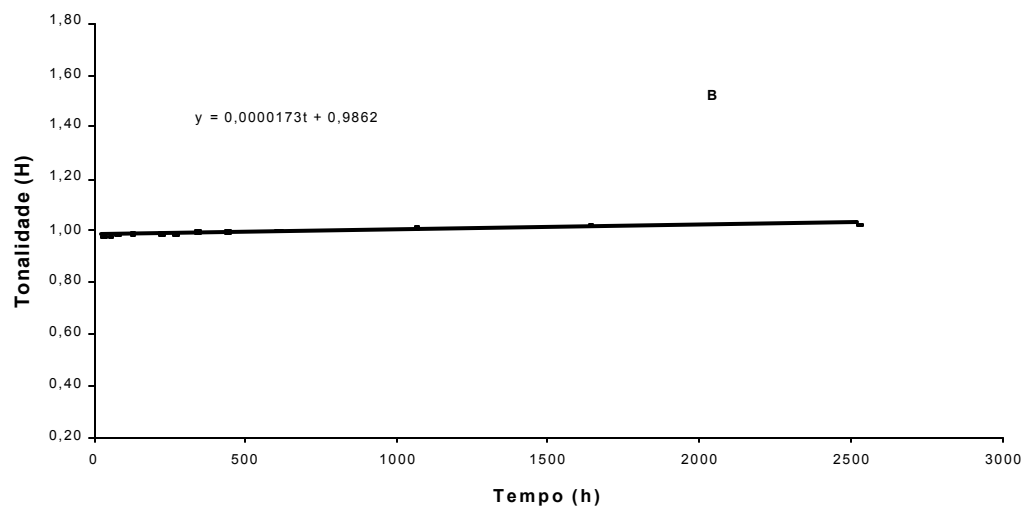
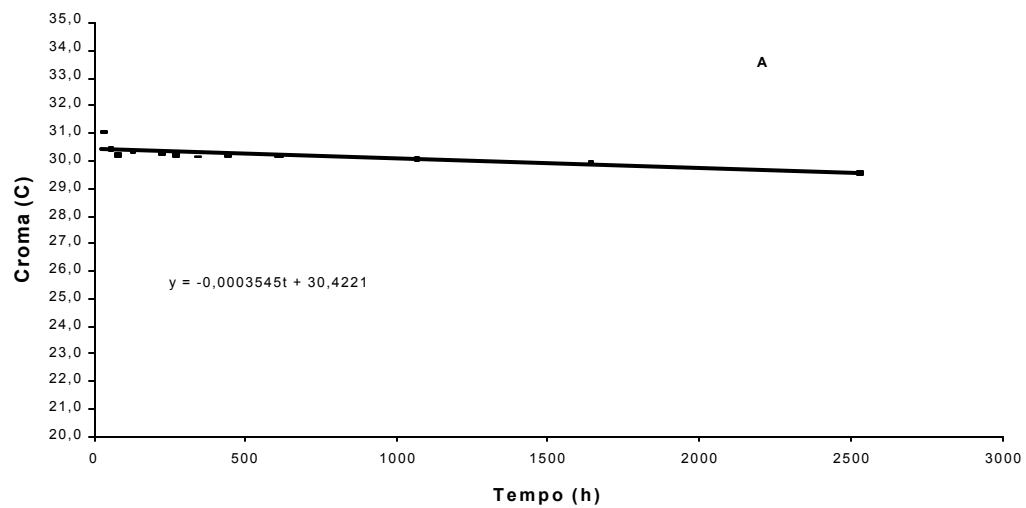


Figura 6 – Comportamento dos parâmetros croma (C) e tonalidade (H) ao longo do tempo, armazenados a 40°C na ausência de luz.

3.1.2.1.2. Temperatura de 60 °C

Para a temperatura de 60°C observou-se uma tendência geral de aumento das coordenadas colorimétricas.

O comportamento da luminosidade (L), pode ser observado na Figura 7, onde apresenta uma tendência de elevação no seu valor quando armazenados a 60°C ao abrigo da luz.

Na avaliação da coordenada “a” houve ligeiro aumento, contrariando a tendência de decréscimo nas demais condições para a mesma coordenada (Figura 8 A). MOLICA (1999), observou aumento da coordenada “a” em tomates desidratados ao longo do período de armazenagem em óleo, porém todas as outras coordenadas, “L” e “b”, aumentaram proporcionalmente, por conseguinte, não alterando a tonalidade em algumas variedades de tomate. O aumento no valor “a”, desse ensaio, pode ser atribuído a possíveis contaminações na cubeta utilizada para leitura colorimétrica, já que a absorvância neste período, claramente, decresceu.

Em contrapartida a coordenada “b”, seguiu a tendência com um pronunciado crescimento, proporcional ao valor da luminosidade (L), indicando que a amostra tornou-se amarela brilhante. O comportamento dessa coordenada é apresentado na Figura 8 B.

Foi observado ligeiro aumento na saturação da cor, o mesmo ocorrendo para a tonalidade (Figura 9 A e B, respectivamente). Lembrando que o croma é obtido pela relação de “a” e “b”, o aumento nesses valores ocasionou a tendência de aumento no croma diferenciando ou dificultando a percepção da cor. No entanto, o aumento na matiz indica que ocorreu a mudança do pigmento do vermelho-alaranjado para uma tonalidade amarela. A mudança da isomeria *trans-cis* do licopeno ocasionada pelo tratamento térmico, apresentou coloração mais clara, menos intensa e menos saturada (BOSCOVIC, 1979)

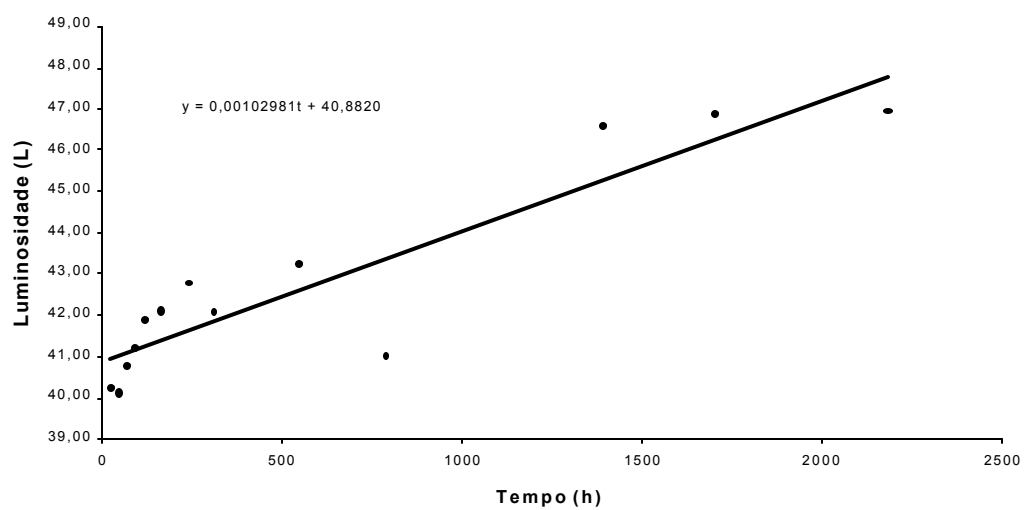


Figura 7 – Comportamento da luminosidade (L) ao longo do tempo na temperatura de 60° C, armazenados ao abrigo da luz.

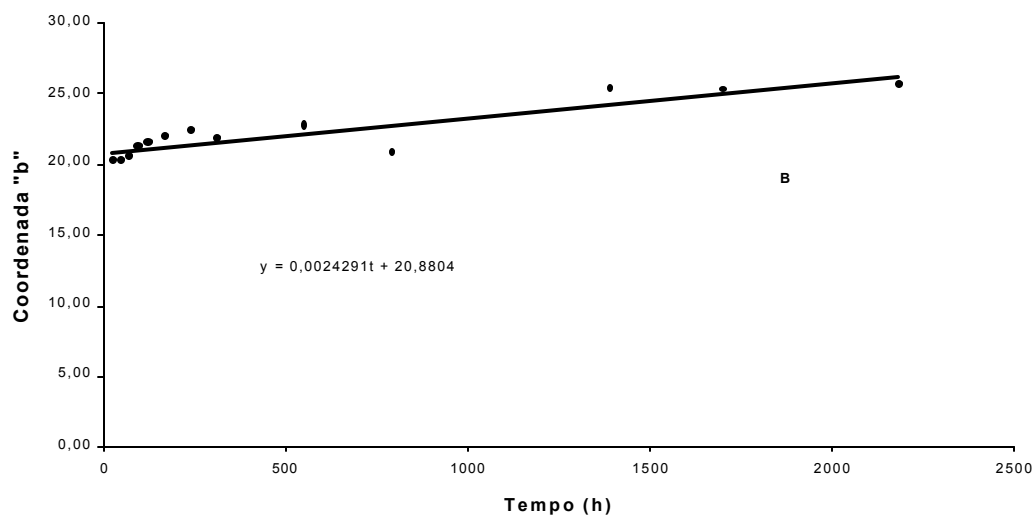
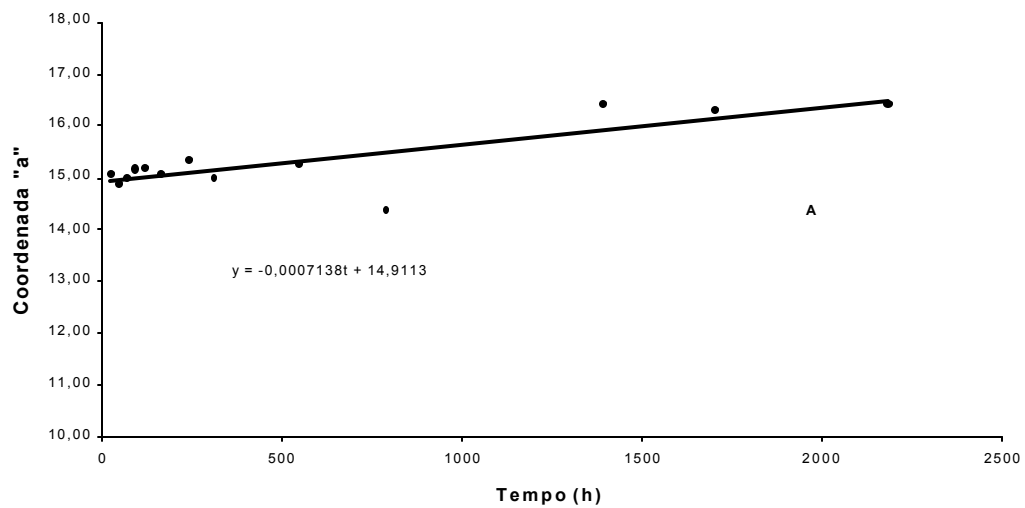


Figura 8 – Comportamento das coordenadas “a” (intensidade do vermelho) e “b” (intensidade do amarelo) ao longo do tempo, armazenados a 60°C na ausência de luz.

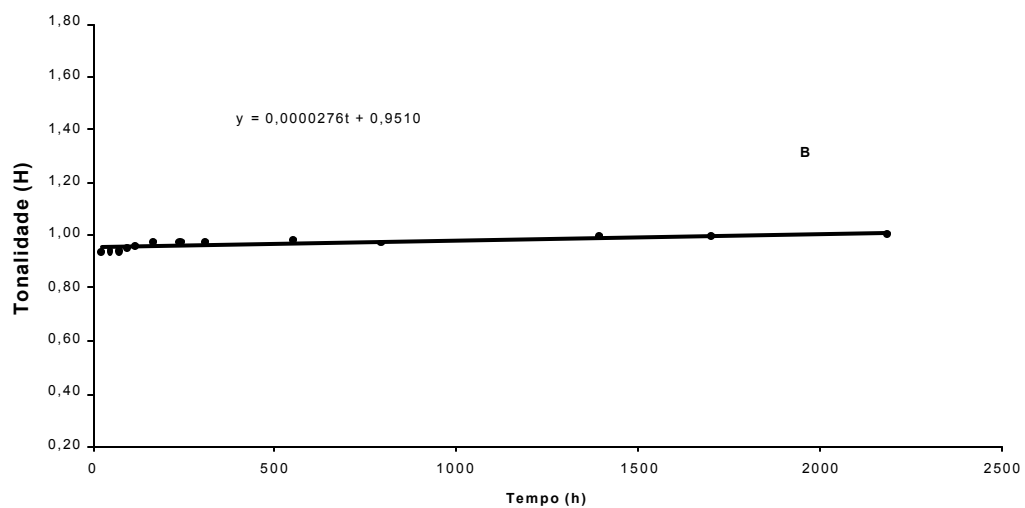
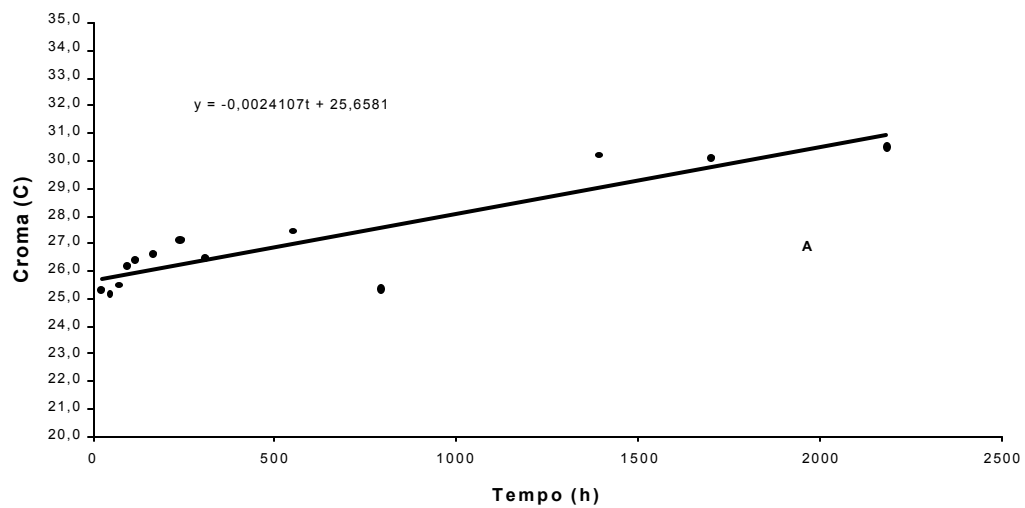


Figura 9 – Comportamento dos parâmetros croma (C) e tonalidade (H) ao longo do tempo, armazenados a 60° C na ausência de luz.

3.1.2.1.3. Temperatura de 80 °C

Para este tratamento as coordenadas colorimétricas comportaram-se de forma esperada, pois em tratamentos mais drásticos a degradação de pigmentos costuma ser mais pronunciada, o que pode ser confirmado ao comparar as duas outras temperaturas testadas nesse ensaio.

O comportamento da luminosidade (L) encontra-se na Figura 10. A coordenada em questão seguiu tendência de aumento, indicando que as amostras aumentaram a luminosidade, conferindo aspecto mais translúcido à cor.

A coordenada “a” apresentou um acentuado decréscimo em seu valor com aumento suave no valor “b”. Uma constância ou ligeiro aumento no valor “b” é esperado, indicando que a medida que a cor vermelha degrada a coloração amarela também o faz, porém em velocidade diferenciada (CONSTANT,1999). O comportamento das coordenadas “a” e “b” estão expostos na Figura 11 A e B, respectivamente.

A Figura 12 apresenta a tendência seguida pelos parâmetros croma (C) e tonalidade (H) da cor. Não houve variação significativa nos valores do croma (C) até o fim do ensaio, podendo a variação ser considerada constante. Este comportamento indica que a cor permanece com a saturação característica do início do experimento, com a mesma percepção da cor (Figura 12 A). Em contraste, os valores da tonalidade apresentaram tendência progressiva de aumento, o que demonstra que ocorreram mudanças da cor inicial para uma matiz amarela (Figura 12 B).

Pode-se inferir que a solução de carotenóides, expresso em teor de licopeno, o mais representativo caroteno no tomate, quando diluído em óleo mineral, apresentou coloração tendendo para o laranja, da qual ao longo do tempo adquiriu matiz amarela.

A literatura relata que os produtos processados de tomate mantêm os atributos de qualidade quando sofrem processos térmicos de preparo e conservação. No entanto, o incremento da temperatura, isolando-se o efeito da luz e disponibilidade de oxigênio, contribuiu para maiores perdas de pigmentos,

o que foi observado pelos parâmetros cinéticos e colorimétricos, observados nesse ensaio.

Cole e Capur (1957b), citados por BOSCOVIC (1979), constataram que a disponibilidade de oxigênio foi mais pronunciada do que o aumento da temperatura e intensidade de iluminação, embora os mesmos contribuíssem para a diminuição da intensidade da cor em polpa de tomate.

Noble (1975), verificou um decréscimo da contribuição do vermelho (obtidos de “a” ou tonalidade, “a/b”), da saturação ($[a^2 + b^2]^{1/2}$) e na luminosidade (L) com o aumento da severidade no tratamento térmico. A redução no conteúdo total de pigmentos ou licopeno isoladamente, foi altamente relacionado com a diminuição do vermelho.

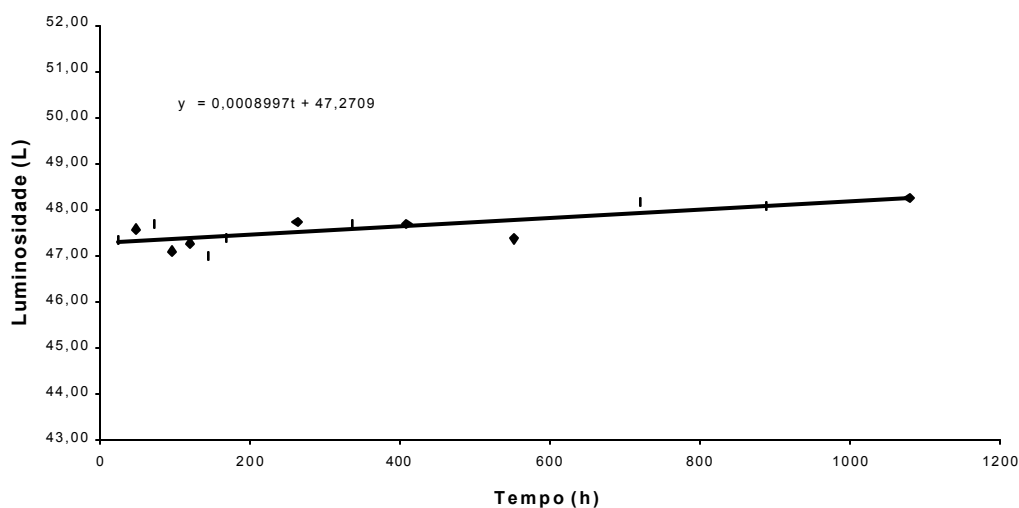


Figura 10 – Comportamento da luminosidade (L) ao longo do tempo na temperatura de 80° C, armazenados ao abrigo da luz.

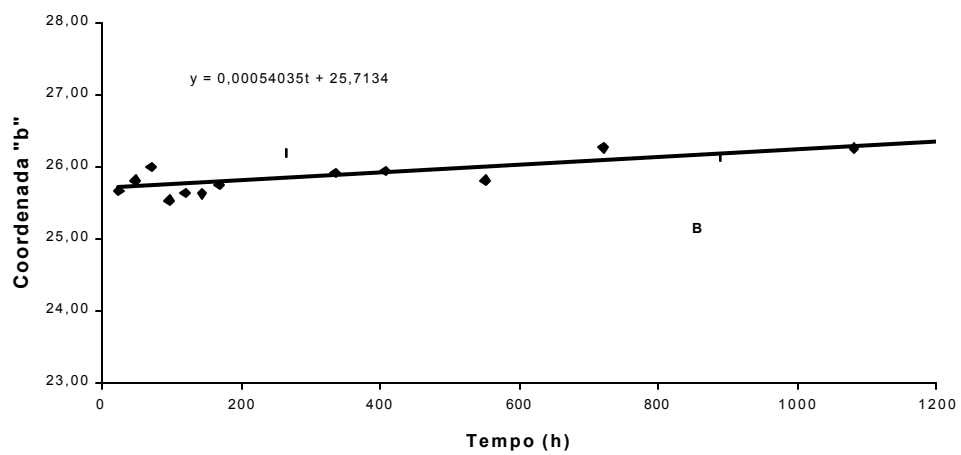
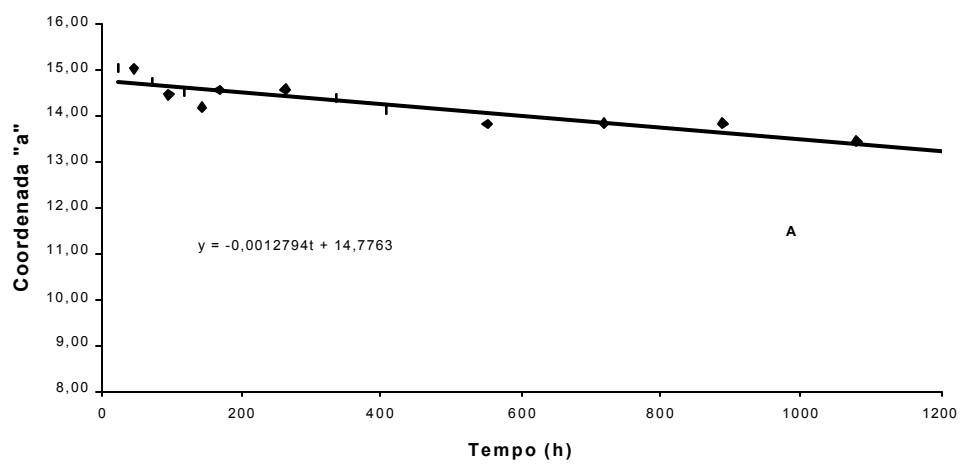


Figura 11 – Comportamento das coordenadas “a” (intensidade do vermelho) e “b” (intensidade do amarelo) ao longo do tempo, armazenados a 80° C, na ausência de luz.

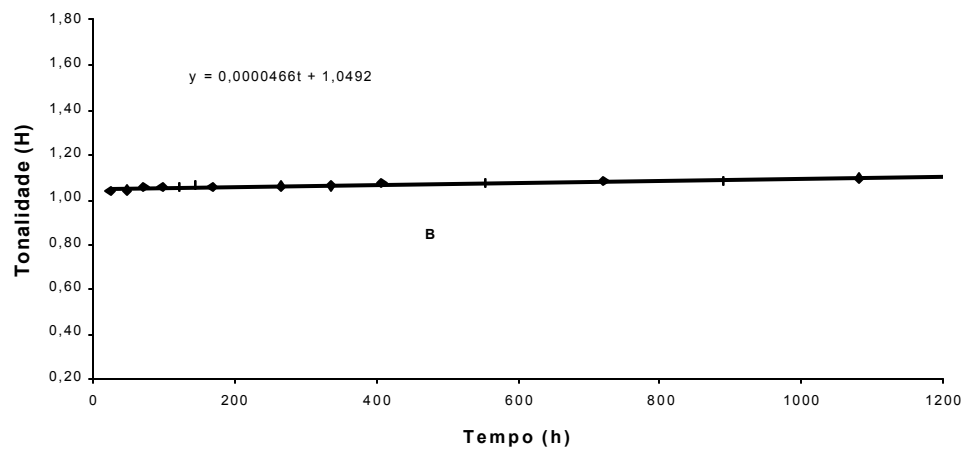
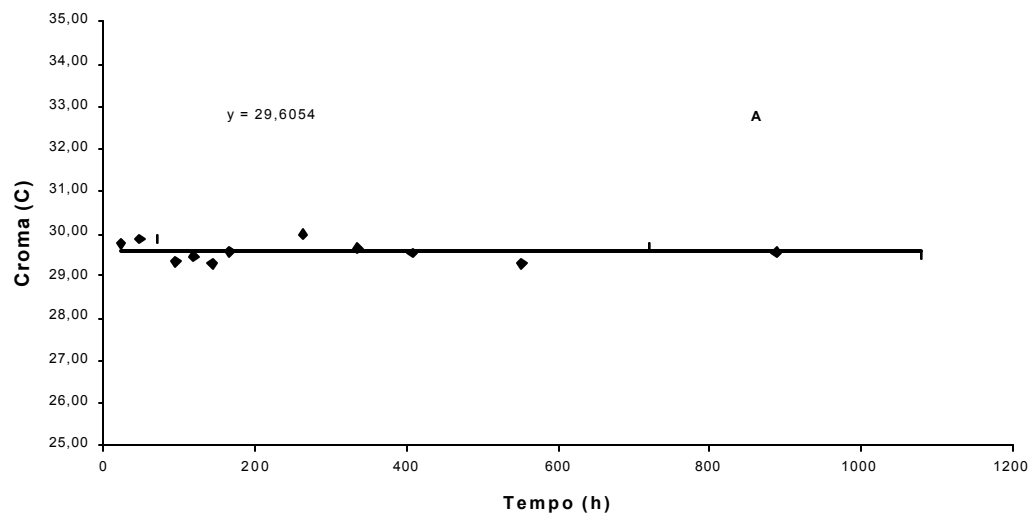


Figura 12 – Comportamento dos parâmetros croma (C) e tonalidade (H) ao longo do tempo, armazenados a 80° C na ausência de luz.

THIAGU et al. (1993), ao estudarem métodos não destrutivos para estimar o conteúdo de pigmentos de tomates inteiros relacionados aos diferentes estádios de maturação (do verde ao muito maduro), por medidas de reflectância, observaram que os valores de luminosidade (L), contribuição do amarelo (b), croma (C) e ângulo da tonalidade (H), decresceram. Por outro lado, a contribuição do vermelho (a) aumentou à medida que os frutos de tomate passaram do estágio de maturação classificado de verde para o muito maduro, com teor de licopeno de 1,45 e 81,64 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Analogamente, pode-se supor que o comportamento inverso ocorre com as coordenadas colorimétricas, quando o pigmento está degradando. No presente experimento, notou-se tendência geral de redução da coordenada “a” e ligeiro ou nenhum aumento das coordenadas “b”, “L”, “H” e “C”.

3.1.2.2. Avaliação do efeito da Luz

A luminosidade (L) apresentou tendência de ligeiro aumento para as condições de exposição do pigmento à luz e, como controle, na ausência de luz. As duas condições foram estocadas a temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo que o aumento na luminosidade foi mais acentuado quando o pigmento foi exposto à luz (Figura 13).

A Figura 14 apresenta o comportamento da coordenada “a” e “b” ao longo do tempo para luz e escuro, onde pode ser observado que a tendência de redução da coordenada “a” foi mais acentuada para luz do que para o escuro (Figura 14 A). A coordenada “b” comportou-se da mesma forma para luz e escuro com ligeiro aumento no valor da coordenada, sendo um comportamento esperado, já que no decréscimo nos pigmentos vermelhos os amarelos são aumentados, porém ambos degradam-se mas o fazem em taxas diferenciadas (Figura 14 B). A diminuição da coordenada “a” indica que a coloração laranja está se tornando mais fraca e mais amarela.

Como apresentado no item 3.1.1, deste capítulo, a exposição do licopeno às condições mais intensas na degradação do pigmento levou a

perdas na coloração de alguns frascos que continham licopeno diluído em óleo mineral, sendo as mudanças perceptíveis aos olhos do observador.

É fato, que o efeito da luz é mais agressivo ao pigmento do que determinadas faixas de temperatura. CONSTANT (1999), estudando a estabilidade de bixina com diferentes agentes encapsulantes menciona ser o efeito de luz mais destrutivo para os pigmentos do urucum. Pelos seus resultados é perceptível que a tendência de decréscimo de pigmento, ao longo do tempo, seja mais pronunciado para luz do que para a temperatura de 75° C, no pigmento não encapsulado, em pH 4, analisado pela coordenada “a”.

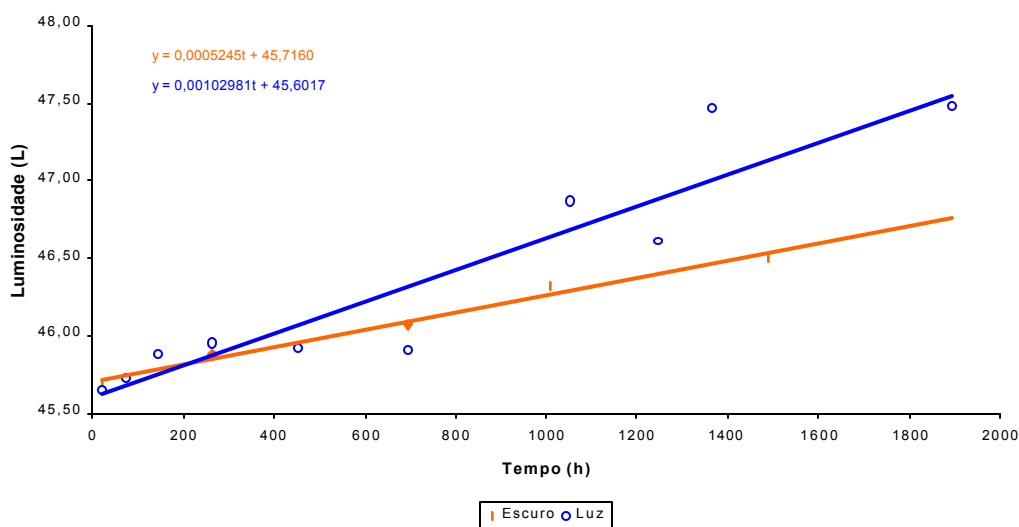


Figura 13 – Comportamento da luminosidade (L) ao longo do tempo expostos à presença e ausência de luz em temperatura ambiente (20±2° C).

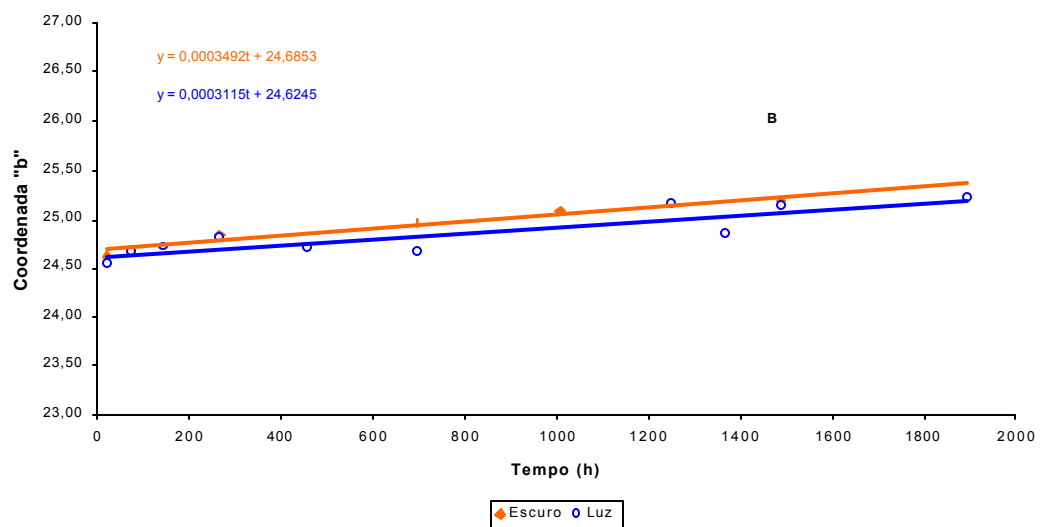
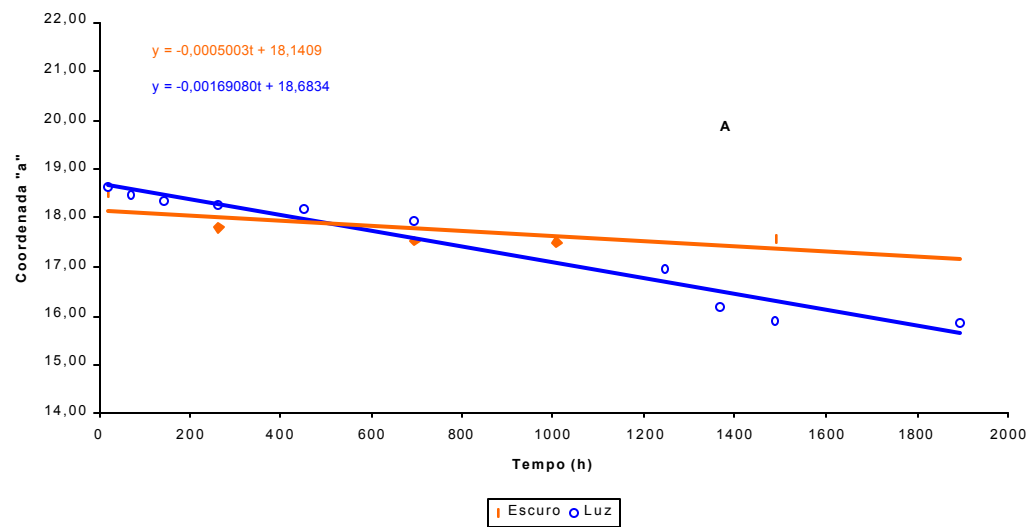


Figura 14 – Comportamento das coordenadas “a” (intensidade do vermelho) e “b” (intensidade do amarelo) ao longo do tempo, expostos à presença e ausência de luz em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

Na Figura 15 A, pode-se observar que houve ligeira queda nos valores do croma (C) para escuro, seguido de aumento ao longo do tempo. Este fato indica que a saturação da cor permaneceu semelhante ao início do experimento, conferindo mesma percepção da matiz da cor. O contrário ocorreu com o efeito da luz, que apresentou declínio desse parâmetro, sugerindo que a percepção da cor ocorre de forma diferenciada ao do início do experimento, facilitando a observação das mudanças ocorridas com a tonalidade (H) (Figura 15 A). Este fato sugere uma mudança no K_d , lembrando-se que a reversão, cineticamente, é mais lenta do que a autooxidação e que a passagem de *trans* para *cis*-licopeno, torna o pigmento mais instável, reativo e menos colorido (BOSCOVIC, 1979; NGUYEN e SCHWARTZ, 1999).

O comportamento da tonalidade (H) é mostrado na Figura 15 B, indicando que o ângulo da matiz está aumentando, conseqüentemente, adquirindo uma tonalidade amarela .

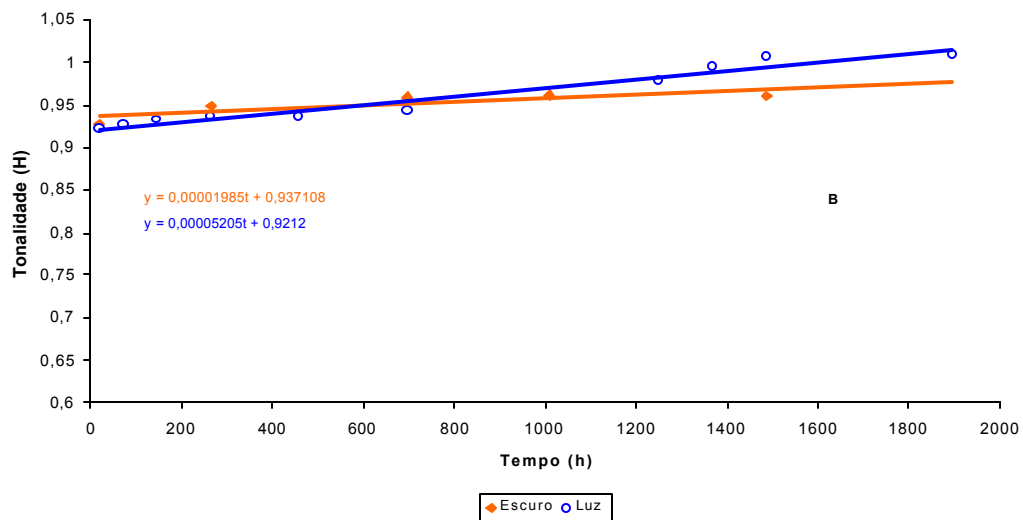
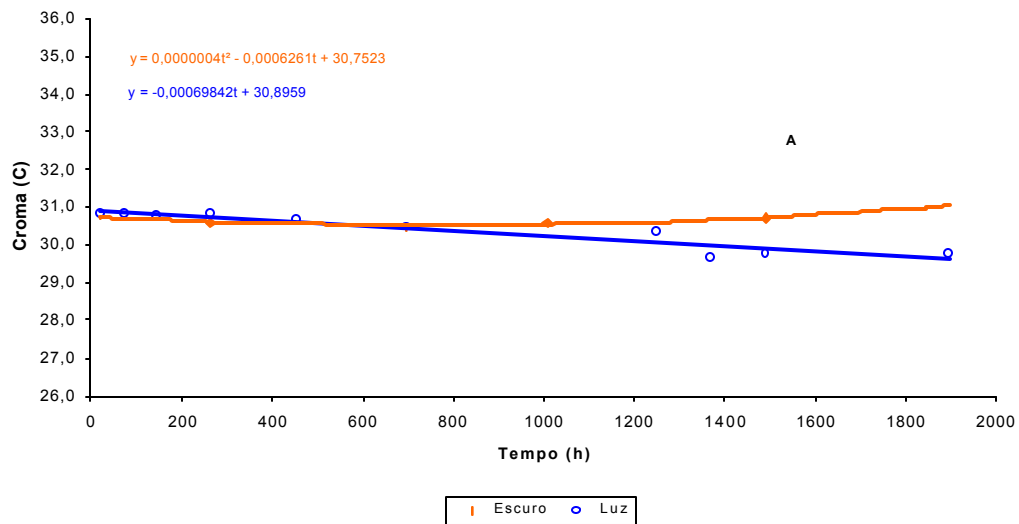


Figura 15 – Comportamento dos parâmetros cromia (C) e tonalidade (H) ao longo do tempo, armazenados na ausência e presença de luz, em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

3.2 – Correlação entre dados espectrofotométricos e colorimétricos

No Quadro 5 estão os coeficientes de correlação linear simples entre as medidas espectrofotométrica lidos em absorbância a 480 nm e as leituras colorimétricas dos parâmetros “L”, “a⁺”, “b⁺”, “C” e “H” das soluções de licopeno no ensaio de estabilidade do pigmento. A análise apresentou correlação alta entre as leituras espectrofotométricas e colorimétricas nas avaliações que apresentaram-se significativas ao nível de 1 e 5 % de probabilidade.

Para a luminosidade a correlação foi negativa para as condições de luz, escuro, a 60°C e 80°C.

A coordenada “a” apresentou correlação positiva, exceto para a temperatura de 60°C, que apresentou comportamento distinto e não esperado, indicando que a medida que a absorbância diminuía a coordenada “a” aumentava.

As correlações entre dados espectrofotométricos e colorimétricos confirmam o comportamento diferenciado para o ensaio da termossensibilidade dos pigmentos extraídos do tomate expostos a 40°C, na ausência de luz. Essa temperatura apresentou correlações médias para todos os parâmetros avaliados, exceto para as coordenadas “L” e “b” que não foram ajustados modelo de regressão, como pode ser observado no presente capítulo, item 3.1.2.1.1, quando relacionada com as reduções nos valores de absorbância.

Para luz, escuro, 60°C e 80°C a coordenada “b” apresentou correlação negativa, indicando que a absorbância decresceu e a intensidade do amarelo aumentou.

A correlação entre a absorbância (A) e croma (C) na condição de exposição a luz foi alta e positiva, definindo que a absorbância decresce e a saturação da cor segue a mesma tendência. Contudo, para o escuro, a correlação com as reduções dos valores de absorbância não foi significativa. A 60°C houve uma correlação negativa, face ao aumento da coordenada “a” nessa temperatura, o que induz a supor que a absorbância diminuía e a saturação aumentava, ou seja, o que poderia indicar que a mistura com as cores acromáticas estavam diminuindo, porém, como são cálculos matemáticos, essa variação pode não ser perceptível aos olhos do observador. No entanto, para o parâmetro H, a correlação foi negativa e alta em todas as condições testadas, verificados pelas leituras no espectrofotômetro e no

colorímetro. Este comportamento sugere que no decréscimo da absorvância, a tonalidade da cor tende a mudar, passando da cor laranja para a amarela.

Nota-se que outros instrumentos, como o colorímetro, além de espectrofotômetros, podem ser usados para auxiliar nos testes de estabilidade, quando a cor é fator de qualidade. É comum a análise apenas das coordenadas “L”, “a” e “b”, no entanto essa pesquisa demonstrou que a análise dos parâmetros croma (C) e tonalidade (H) da cor contribuem sensivelmente para a compreensão das alterações.

Quadro 5 - Coeficientes de correlação entre as leituras de absorvância ($Abs_{480\text{nm}}$) com os parâmetros colorimétricos “L”, “a”, “b”, “C” e “H”.

Características			Coeficientes
Escuro	Abs x	L	-0,87*
		a	0,96**
		b	-0,93**
		C	0,57 ^{ns}
		H	-0,97*
Luz	Abs x	L	-0,95**
		a	0,99**
		b	-0,86**
		C	0,96**
		H	-0,99**
40°C	Abs x	a	0,62*
		C	0,64*
		H	-0,56*
60°C	Abs x	L	-0,96**
		a	-0,83**
		b	-0,95**
		C	-0,94**
		H	-0,96**
80°C	Abs x	L	-0,74**
		a	0,92**
		b	-0,77**
		C	0,21 ^{ns}
		H	-0,97**

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade pelo teste “F”, respectivamente.

ns – não significativo a 5% de probabilidade

sofridas pelos pigmentos expostos nas condições experimentais apresentando correlações altas para a maioria das condições, o que nem sempre ocorre com as coordenadas “L” e “b”. Algumas pesquisas comparando tais coordenadas concluíram ser a coordenada “a” a que mais representa as alterações sofridas pelos pigmentos vermelhos (CONSTANT, 1999). NOBLE (1975), ainda relaciona ($r = 0,907$) o decréscimo do licopeno isolado de polpa de tomate concentrada com a diminuição da cor vermelha, sobretudo, com as medidas dos valores de Hunter “a/b”. Estes achados estão em concordância com os resultados dessa pesquisa, pois o valor “a” e “H” apresentam boas correlações com as reduções dos valores de absorbância ao longo do tempo em diferentes condições de armazenagem.

Segundo THIAGU et al. (1993), a relação dos valores “a/b” foi um dos parâmetros mais importantes observados em diferentes estádios de maturação do tomate com correlação significativamente alta ($r = 0,99$) com o conteúdo de licopeno, mostrando coeficiente de correlação mais alto do que o valor “a” ($r = 0,92$). A redução no conteúdo total de pigmentos ou licopeno isoladamente, foi altamente relacionada com a diminuição do vermelho (NOBLE, 1975).

A análise do croma e tonalidade permite uma visualização geral do que ocorre com o pigmento, contribuindo para conclusões mais elaboradas junto com as demais coordenadas.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A elevação da temperatura e o efeito da luz, são condições aviltantes na estabilidade de licopeno obtidos de tomates diluídos em óleo mineral para o estudo da degradação. Quanto maior é o incremento da temperatura de armazenamento maior é a velocidade de degradação e, por conseguinte, menor é o tempo de meia-vida. O efeito da luz foi considerado o mais drástico na degradação de licopeno, superando a maior temperatura testada que foi de 80°C, em velocidade de degradação e tempo de meia-vida.

O comportamento para 40°C, embora não tenha ajustado modelo de regressão para estimar os parâmetros cinéticos K_d e $t_{1/2}$, foi observada redução nos valores da coordenada “a”, que está relacionado com o decréscimo no conteúdo de licopeno, sugerindo que há degradação ao longo do tempo, mas não de modo linear.

O licopeno armazenado no escuro em temperatura ambiente ($20\pm 2^\circ\text{C}$), foi o que apresentou melhor estabilidade ao longo do tempo testado, baseado nos parâmetros cinéticos e colorimétricos.

A degradação sofrida pelo pigmento, medidas através da absorbância, mostraram-se concordantes com as variações colorimétricas através da leitura das coordenadas “L”, “a”, “b”, “C” e “H”. Sendo as coordenadas “a”, “b” e “H” as que apresentam melhores correlações com as reduções nos valores da absorbância, ou seja, no conteúdo de licopeno.

Deve-se ressaltar que o óleo mineral utilizado como diluente, foi escolhido, por ser uma base inerte, porém sua ingestão é contra-indicada, portanto sua aplicação direta em alimentos deve ser descartada. O óleo

mineral pode ter agido como barreira protetora dos pigmentos, desta forma faz-se necessário estudos de outros diluentes e seu comportamento em produtos alimentícios.

CONCLUSÕES GERAIS

A eficiência no rendimento da extração do licopeno é determinada pelo tipo de solvente e forma da matéria-prima e seus derivados empregados.

A acetona foi o solvente com melhor poder extrator do pigmento licopeno obtido de tomate, seguido pelo hexano-etanol (1:1) que extraiu de forma semelhante, quando empregou-se a polpa e o tomate parcialmente desidratado.

O etanol foi o que apresentou menor eficiência de extração de licopeno independente da forma da matéria-prima empregada.

Ao avaliar a degradação do licopeno ante a ação da luz e temperatura, foi constatado pelos parâmetros cinéticos (K_d e $t_{1/2}$) que a ação da luz foi mais destrutiva que o incremento da temperatura. A temperatura de 40°C seguiu comportamento distinto das demais, não sendo explicadas essas variações por nenhum modelo estatístico, porém, mudanças na tonalidade foram detectadas pelas leituras das coordenadas “a”, “b” e “H”. O armazenamento no escuro, usado como controle, foi o que apresentou melhor estabilidade do pigmento avaliado.

A degradação das soluções de licopeno foi detectada pelo valor “a” que quantifica a contribuição do vermelho, de modo que, esta diminui com o tempo de exposição do pigmento às condições testadas, indicando que a contribuição do vermelho está diminuindo, e neste caso, a tonalidade está alterando-se aumentando a contribuição do amarelo medida pelo valor “b”.

A coordenada “a” foi a que apresentou melhor correlação com as reduções das leituras espectrofotométricas ao longo do tempo de

armazenamento, seguida da “H” e “b”. Contudo, os valores de “a” e “H”, contribuíram sensivelmente para a compreensão do comportamento da degradação qualitativa do licopeno exposto às condições de estocagem neste trabalho.

Com o aprimoramento tecnológico no que diz respeito a solubilidade e aplicação, este pigmento, além da vantagem de exibir potencial biológico, pode ser uma opção como corante para produtos alimentícios, sobretudo por apresentar boa estabilidade a temperatura, quando a luz e a disponibilidade de oxigênio forem reduzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAYA, D. R., BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. Curso sobre pigmentos naturais. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1982. 56 p.
- ARAÚJO, J.M. **Química de Alimentos** – Teoria e Prática. Viçosa, MG: UFV, 1995. 335p.
- BIZIRI, J.N; WAREM, I.A. Citric acids and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice. **Journal of Food Science**., v.59, n.1, p.130-134, 1994.
- BARA, M.T.F e VANETTI, M.C.D. Atividades antimicrobiana de corantes naturais sobre microorganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, n.1, p. 119-200, 1992.
- BARBOSA, L. C. A. **Química orgânica**; uma introdução para as ciências agrárias e biológicas. Viçosa, MG: UFV, 1998. 354p.
- BOBBIO, F.; BOBBIO, P. **Introdução a Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1992. 235p.

- BOSCOVIC, M. A. Fate of lycopene in dehydrated tomato products: carotenoid isomerization in food system. **Journal Food Science and Technology**, v.44, n.1, p. 84-86, 1979.
- BOILEAU, A. C., MERCHEN, N.R., WASSON, K., ATKINSON, C. A., JR, J.W.E. *Cis*- Lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. **American Society for Nutritional Sciences**, v.1, p. 235-238, 1999.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: **Natural Food Colorants**. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1996. 343p.
- CARVALHO, P.R.N. Potencialidades dos corantes naturais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n.1, p.224-225, 1992.
- COLE, E. R., CAPUR, N. S. The stability of lycopene. 1. degradation by oxygen. **Journal Food Science and Technology**, v.8, n.6, p.360-365, 1957(a).
- COLE, E. R., CAPUR, N. S. The stability of lycopene. 2. oxidation during heating of tomato pulps. **Journal Food Science and Technology**, v.8, n.6, p.366-370, 1957(b).
- CONSTANT, P. B. L. **Microencapsulamento de bixina: Agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 136p. Dissertação (Mestrado em...) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- DAVIS, W. B., Stability of lycopene. **Anal Chemistry**, v. 21, p.1500-1505, 1949.
- ESTUDO DAS CORES. [S.1.: s.n.], [19--]. 32p.
- FIGUEIREDO, I. B. Conceito geral sobre carotenóides. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, n.35, p.47-69, 1973.

- GIL, A. R., FONSECA, H. CAMPOS, H., SANCHEZ, M. I. R. Estudo sobre perdas no processamento industrial do tomate. Piracicaba, SP: **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 44, n.1, p. 229-315, 1987.
- GILMAN, A. G., **As bases farmacológicas da terapêutica**. Guanabara Koogan, 1991. 1232p.
- GRANADO, F., OLMEDILLA, B., BLANCO, I., ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 2136-2140, 1992.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.
- HART, D. J., SCOTT, K. J. Development and evaluation of HPLC methods for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, v. 54, p.101-111, 1995.
- HEIDRAS, J.; HUMBER, D. C., CULLY, J. Process for extraction of carotenoid from natural material. **German Federal Republic Patent Application**, 1997.
- HUNTER LAB. [S.1.: s.n.], [19--]. 76p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo, SP: 1985. 533p.
- LEE, C. Y., ROBINSON, R. W. Influence of the crimson gene on vitamin A content of tomato. **Hortscience**, v.15, p.260-261, 1980.

- LOVRIC, T., SABLEK, Z., BOSCOVIC, M. *Cis-trans* isomerization of lycopene and colour stability of foam-mat dried tomato paste powder during storage. **Journal Food Science and Technology**, v.21, n.2, p.641-647, 1970.
- MARTINEZ, J.; DAMIDAUX, R. Rapid methods to asses the chlorophyll and carotenoid content of leaves and fruits using a microplate reader. **Annals Applied and Biology**, v.123, n.3, 673-684 p.,1993.
- MELO, P. C. T. Retrospectiva da agroindústria do tomate no Brasil nos anos 90. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.109-111, 1993.
- MIERS, J.C., WONG, F.F., HARRIS, J. G., DIETRICH, W. C. Factors affecting storage stability of spray-dried tomato powder. **Food Tecnology**, v.12, p.542-546, 1958.
- MINAMI, K., FONSECA, H. **Tomate-Produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. Série Extensão Agroindustrial 8, Governo do Estado de São Paulo, 1981.
- MOLICA, E. M. **Avaliação dos parâmetro envolvidos na produção de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) desidratado**. Viçosa, MG:UFV,1999. 59p. Dissertação (Mestrado em...) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- NGUYEN, M. L., SCHWARTZ, S. J. Lycopene: chemical and biological properties. **Food Tecnology**, v.53, n.2. p.38-45, 1999.
- NIR, Z.; HARTAL, D. Lycopene in functional foods – A new commercial natural carotenoid from tomatoes. **Food Tech Europe**, v.2, n.4, p. 35-39, 1996.
- NOBEL, A. C. Investigation of the color changes in heat concentrated tomato pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, n.1, p. 45-46 1975.

OLIVEIRA, T. T., MASCARENHAS, J. M., STRINGHETA, P.C., QUEIROZ, M. E. L. R., LIMA, L. R. P.. Avaliação das concentrações dos minerais (Ca, K, Fe, Na, Mg) e metais pesados (Cr, Al, Pb, Co, Cu, Ni, Zn e Nin) em corantes naturais urucum (norbixina), carmim, clorofila, monascus, antocianinas e vermelho de beterraba. in: II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos.1997. **Resumos...** Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos,1997.

PIMENTEL, F.A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de Pigmentos de semente de urucum (*Bixa orellana*, L.)**. Viçosa, MG:UFV,1995. 132p. Dissertação (Mestrado em...) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

PORRINE, M., RISO, P., TESTOLIN, G. Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.353-361, 1998.

RAYMUNDO, L. C., CHICHESTER, C. O, SIMPSON, K. L. Light dependent carotenoid synthesis in tomato fruit. **Journal Food Science and Technology**,v.24, p.59-64, 1976.

SADLER, G., DAVIS, J., DEZMAN, D. Rapid extration of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. **Journal of Food Science**, v.55, n.5, p.1460-1461, 1990.

SAINI, S.P.S., SINGH, S. Juice composition of new tomato hybrids. **Journal Food Science and Technology**, v.31, n.3, 231-32 p.,1994.

SCOTT, K. J. Further obsevation on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in food by HPLC. **Food Chemistry**, v.45, p.357-364, 1992.

STAHL, W., SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **American Institute of Nutrition**, p.2161-2166, 1992.

STRINGHETA, P.C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis miniuflora*, Pal de Beauv).** Campinas, UNICAMP, 1991, 138p. Tese (Doutorado em ...) - Universidade Estadual de Campinas, 1991.

SUDHAKAR, D. V., MAINI, S. B. Stability of carotenoids during storage of mango pulp. **Journal Food Science and Technology**, v.31, n.3, p.228-230, 1994.

TAKAHASHI, M., YABIKU, H. Corantes Naturais: Usos, Restrições e Perspectivas. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, n.1, p.246-247, 1992.

TAN, B. Analytical and preparative chromatography of tomato paste carotenoids. **Journal of Food Science**, v.53, n.3, p.954-959, 1988.

THIAGU, R., ONWUZULU, O. C., RAMANA, K. V. R. A non-destructive measurement of pigments of whole tomato by reflectance technique. **Journal Food Science and Technology**, v.30, n.2, p.92-96, 1993.

TORRICELLA, R.; PINO, J. A.; CARDOSO, M. Influencia de la mezcla de variedades rosadas y blancas sobre la durabilidad del zumo natural de pomelo. **Alimentaria**, v.45, 1994.

TORRICELLA, R.; PINO, J.A.; CARDOSO, M. Influencia de la mezcla de variedades rosadas y blancas sobre la durabilidad del zumo natural de pomelo II. Correlacion entre los índices químicos y sensoriales. **Alimentaria**, v.45, 1994.

WILLIAMS, R. J., BRITTON, G., GOODWIN, T. W. The biosynthesis of cyclic carotenes. **Biochemistry Journal**, v.105, p. 99-105, 1967.

- WILBERG, V. C., AMAYA, D. R. Quantificação de β -caroteno e licopeno em tomates e em alguns dos seus produtos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.13, n.2, p.132-141, 1993.
- WISSGOTT, U; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p.298-302, 1996.
- WONG, F. F., BOHART, G.S. Observation on the color of vacuum-dried tomato juice powder during storage. **Food Technology**, v.11, p.293-297, 1957.
- VAN BREEMEM, R. B., SCHMITZ, H. H., SCHWARTZ, S. J. Fast atom bombardment tandem mass spectrometry of carotenoids. **Journal Food Science and Technology**, v.43, p.384-389, 1995.
- VIGLIO, E. C. B. Tomate industrial, mudança no mercado de derivados. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 15, n.10, p. 49-52, 1995.
- YAMANO, S., ISHII, T., NAKAGAWA, M., IKENAGA, H., MISAWA, N. Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.6, p.1112-1114, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A

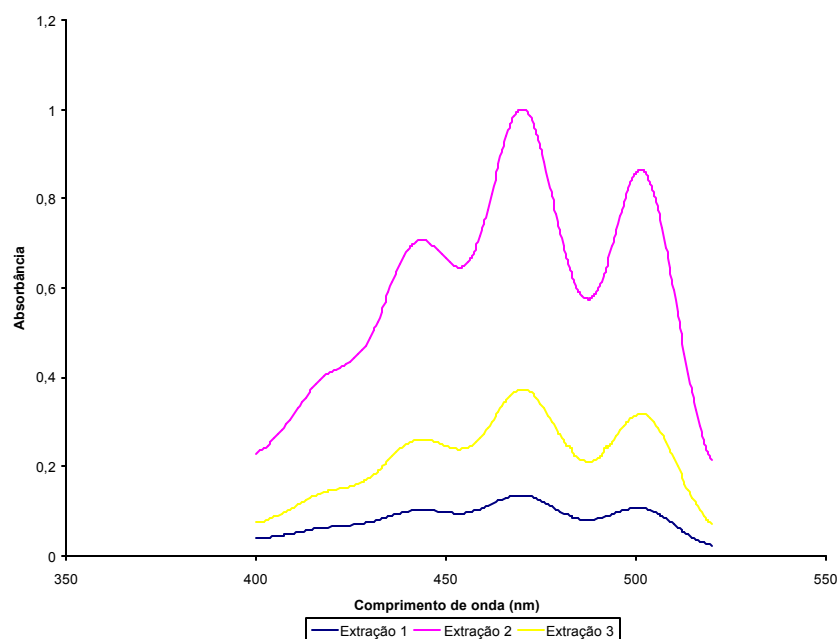


Figura 1 A – Espectros de absorção das três etapas de extração de carotenóides, expressos em teor de licopeno, da polpa de tomate utilizando acetona como solvente extrator.

Quadro 1 A – Resumo da análise de variância (ANOVA) da extração, utilizando seis solventes e duas matérias-primas, no teor de licopeno (mg 100g⁻¹).

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios
Solvente (S)	5	133,3573 ^{**}
Matéria-prima (MP)	1	13,9861 ^{**}
S x MP	5	19,4623 ^{**}
Resíduo	36	1,0549

^{**} significativo a 1% de probabilidade

Quadro 2 A – Resumo análise de variância (ANOVA) das etapas de extração, no teor de licopeno (mg 100g⁻¹).

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios
Tratamento (T)	11	23,5782 ^{**}
Resíduo (a)	36	0,3516 ^{**}
Extração (E)	2	23,3196 ^{**}
E x T	22	29,6013 ^{**}
Resíduo (b)	72	0,6490 ^{**}

^{**} significativo a 1% de probabilidade

APÊNDICE B

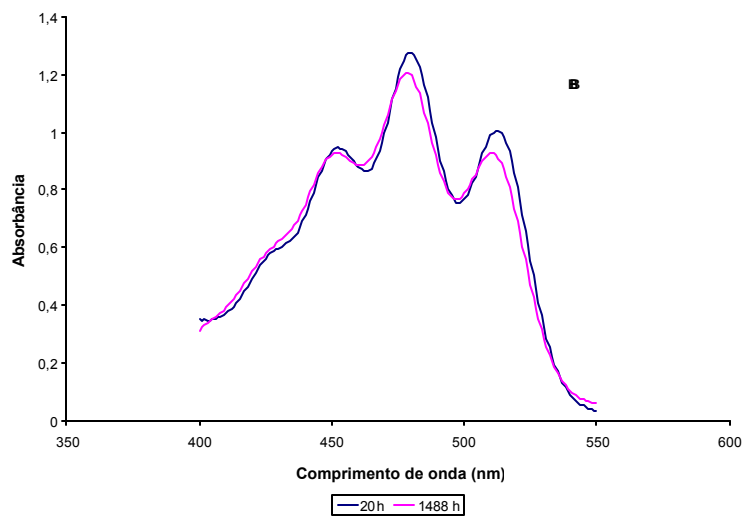
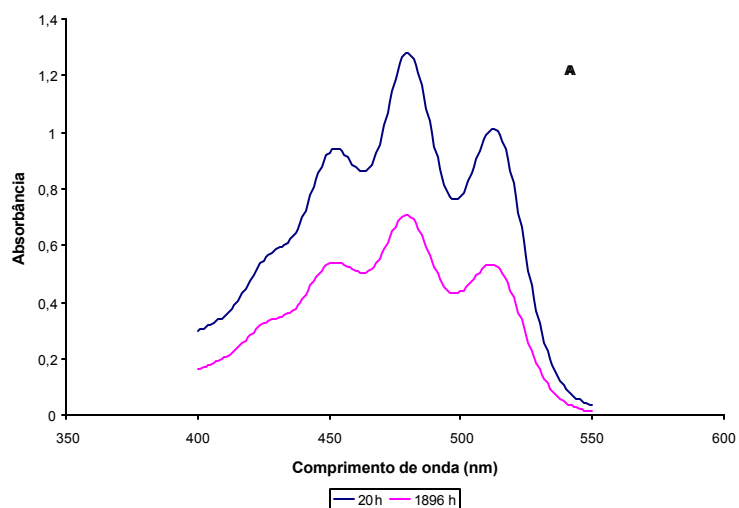


Figura 1 B – Espectros de absorção inicial e final na avaliação da estabilidade de licopeno armazenados na luz (A) e no escuro (B), em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

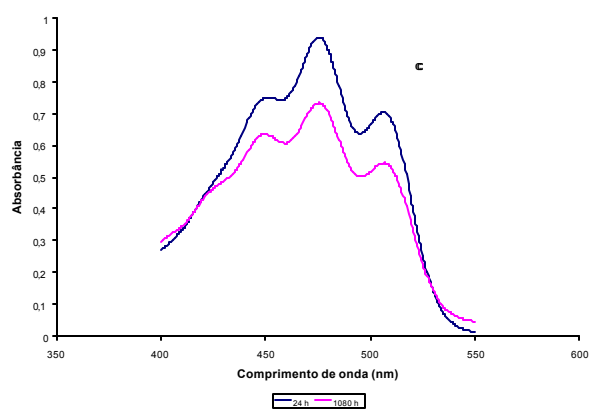
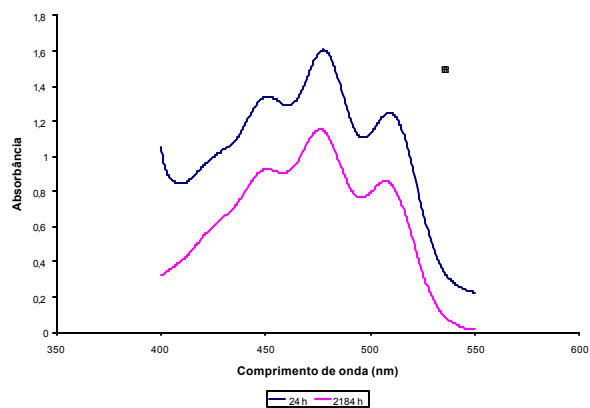
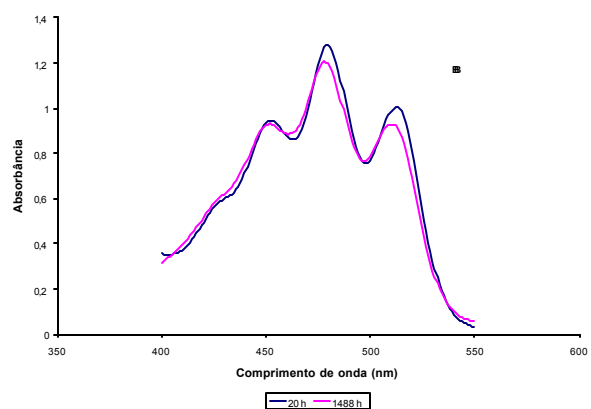


Figura 2 B – Espectros de absorção inicial e final na avaliação da estabilidade de licopeno armazenados à 40°C (A), 60°C (B) e 80°C (C), na ausência de luz.

Quadro 1 B – Valores observados para cada parâmetro espectrofotométrico (absorbância) e colorimétrico (L, a, b, C e H) ao longo do tempo, nas condições de armazenamento no escuro, luz, 40° C, 60° C e 80° C

Tempo (h)	Repetição	Escuro					
		Absorbância	L	a	b	C	H
20	1	1,278	45,61	18,52	24,60	30,7921	0,9255
20	2	1,273	45,66	18,42	24,56	30,7000	0,9273
20	3	1,277	45,80	18,51	24,68	30,8500	0,9273
264	1	1,243	45,87	17,84	24,85	30,5907	0,9482
264	2	1,245	45,79	17,80	24,78	30,5105	0,9479
264	3	1,223	45,99	17,76	24,88	30,5685	0,9509
696	1	1,218	46,05	17,58	24,99	30,5542	0,9577
696	2	1,226	46,04	17,53	24,91	30,4600	0,9576
696	3	1,195	46,14	17,46	24,99	30,4853	0,9610
1008	1	1,183	46,41	17,52	25,15	30,6508	0,9623
1008	2	1,200	46,37	17,56	25,12	30,6491	0,9607
1008	3	1,199	46,18	17,43	24,98	30,4599	0,9616
1272	1	1,222	46,52	17,62	25,18	30,7327	0,9602
1272	2	1,206	46,25	17,57	25,07	30,6139	0,9595
1272	3	1,211	46,18	17,54	25,05	30,5803	0,9599
1488	1	1,197	46,52	17,63	25,18	30,7384	0,9600
1488	2	1,220	46,47	17,59	25,15	30,6909	0,9605
1488	3	1,209	46,51	17,53	25,19	30,6894	0,9628
3408	1	1,119	43,87	15,58	23,32	28,0457	0,9818
3408	2	1,142	43,42	15,40	23,07	27,7378	0,9822
3408	3	1,136	43,52	15,66	23,17	27,9658	0,9764
Tempo (h)	Repetição	Luz					
		Absorbância	L	a	b	C	H
20	1	1,280	45,77	18,73	24,65	30,959	0,921
20	2	1,282	45,68	18,52	24,49	30,704	0,923
20	3	1,287	45,49	18,6	24,51	30,768	0,922
72	1	1,256	45,9	18,53	24,81	30,966	0,929
72	2	1,272	45,61	18,42	24,59	30,724	0,928
72	3	1,263	45,69	18,45	24,64	30,782	0,928

Continua...

Quadro – 1 B, Cont.

144	1	1,221	45,94	18,29	24,75	30,775	0,934
144	2	1,249	45,89	18,4	24,75	30,840	0,932
264	1	1,266	45,97	18,25	24,79	30,783	0,936
264	3	1,258	45,95	18,27	24,82	30,819	0,936
454	1	1,227	46	18,18	24,76	30,718	0,937
454	2	1,240	45,89	18,18	24,68	30,653	0,936
454	3	1,241	45,87	18,16	24,68	30,641	0,936
696	1	1,241	45,88	17,99	24,66	30,525	0,941
696	2	1,171	45,89	17,8	24,66	30,413	0,946
696	3	1,196	45,96	17,99	24,71	30,565	0,941
1056	1	0,931	47,13	16,72	25,3	30,326	0,987
1056	2	0,949	46,94	16,87	25,16	30,292	0,980
1056	3	1,037	46,52	17,24	25,01	30,376	0,967
1248	1	1,016	46,58	17,48	25,01	30,513	0,961
1248	2	0,664	47,62	14,95	25,04	29,163	1,033
1248	3	0,854	45,62	16,09	24,5	29,311	0,990
1368	1	0,981	46,81	17,17	25,12	30,427	0,971
1368	2	0,571	48,55	13,95	25,11	28,725	1,064
1368	3	0,874	47,02	16,59	25,15	30,129	0,988
1896	1	0,707	47,55	15,71	25,26	29,747	1,014
1896	2	0,782	47,22	16,23	25,15	29,932	0,998
1896	3	0,696	47,67	15,6	25,22	29,655	1,017
264	2	1,253	45,93	18,26	24,82	30,813	0,937
40° C							
Tempo (h)	Repetiç ão	Absorbâ ncia	L	a	b	C	H
24	1	1,034	48,07	17,25	25,72	30,9690	0,9800
24	2	1,045	48,05	17,25	25,72	30,9690	0,9800
24	3	1,031	48,18	17,36	25,85	31,1383	0,9794
48	1	1,027	46,72	16,97	25,07	30,2735	0,9757
48	2	1,024	46,91	17,04	25,22	30,4370	0,9766
48	3	1,021	46,94	17,06	25,27	30,4896	0,9770
72	1	1,002	46,53	16,65	25,05	30,0786	0,9842
72	2	1,007	46,78	16,71	25,25	30,2785	0,9862

Continua...

Quadro – 1 B, Cont.

72	3	1,000	46,83	16,77	25,35	30,3950	0,9864
120	1	0,991	46,85	16,61	25,34	30,2986	0,9906
120	2	0,986	46,87	16,60	25,32	30,2764	0,9905
120	3	0,984	46,83	16,68	25,41	30,3956	0,9899
216	1	0,983	46,97	16,65	25,36	30,3373	0,9898
216	2	0,990	47,01	16,60	25,38	30,3266	0,9916
216	3	0,987	46,93	16,50	25,25	30,1631	0,9920
264	1	0,990	46,99	16,57	25,34	30,2767	0,9917
264	2	0,994	46,92	16,54	25,28	30,2101	0,9914
264	3	0,996	46,91	16,54	25,27	30,2017	0,9912
336	1	0,999	47,07	16,48	25,39	30,2695	0,9951
336	2	0,992	46,55	16,28	25,19	29,9929	0,9970
336	3	0,994	46,72	16,39	25,33	30,1702	0,9965
432	1	0,982	46,91	16,42	25,39	30,2369	0,9967
432	2	0,980	46,86	16,49	25,44	30,3169	0,9957
432	3	0,987	46,69	16,38	25,31	30,1480	0,9964
600	1	0,984	46,65	16,19	25,22	29,9694	1,0001
600	2	0,984	46,83	16,25	25,44	30,1870	1,0024
600	3	0,987	46,86	16,40	25,50	30,3185	0,9993
1056	1	0,988	46,08	16,00	25,51	30,1125	1,0106
1056	2	0,989	47,04	15,93	25,50	30,0668	1,0124
1056	3	0,983	47,98	15,95	25,51	30,0859	1,0120
1632	1	1,005	47,23	15,79	25,66	30,1291	1,0192
1632	2	0,981	46,75	15,47	25,28	29,6378	1,0216
1632	3	0,984	47,11	15,55	25,57	29,9270	1,0244
2520	1	0,959	46,44	15,19	25,08	29,3214	1,0262
2520	2	0,991	46,83	15,83	25,37	29,9036	1,0129
2520	3	1,040	46,51	15,36	25,14	29,4610	1,0223
4200	1	0,944	47,17	15,38	25,63	29,8905	1,0303
4200	2	0,933	47,09	15,36	25,57	29,8288	1,0299
4200	3	0,942	47,24	15,47	25,69	29,9883	1,0288

Continua...

Quadro – 1 B, Cont.

Tempo (h)	Repetiç ão	60° C					
		Absorbâ ncia	L	a	b	C	H
24	1	1,584	40,85	15,38	20,90	25,9491	0,9364
24	2	1,783	39,92	14,85	20,01	24,9183	0,9324
24	3	1,727	39,84	14,88	20,10	25,0085	0,9335
48	1	1,732	40,73	15,22	20,81	25,7819	0,9393
48	3	1,628	40,03	14,83	20,22	25,0754	0,9380
72	1	1,420	41,89	15,58	20,81	25,9960	0,9281
72	2	1,579	39,56	14,36	19,93	24,5645	0,9464
72	3	1,583	40,83	15,08	21,00	25,8536	0,9480
96	1	1,514	40,95	15,04	21,09	25,9035	0,9513
96	2	1,474	42,21	15,69	22,10	27,1032	0,9534
96	3	1,564	40,39	14,75	20,65	25,3769	0,9505
120	1	1,427	41,90	15,18	21,61	26,4088	0,9584
120	2	1,480	41,86	15,22	21,56	26,3909	0,9561
120	3	1,467	41,87	15,13	21,53	26,3146	0,9582
168	1	1,537	41,22	14,58	21,23	25,7544	0,9690
168	2	1,417	42,55	15,38	22,40	27,1718	0,9691
168	3	1,431	42,51	15,16	22,26	26,9320	0,9729
240	1	1,354	42,40	15,24	22,12	26,8617	0,9675
240	2	1,345	43,17	15,52	22,67	27,4736	0,9705
240	3	1,438	42,75	15,20	22,32	27,0041	0,9729
312	1	1,441	41,33	14,67	21,37	25,9208	0,9692
312	2	1,238	43,57	15,88	23,10	28,0318	0,9685
312	3	1,516	41,33	14,41	20,98	25,4521	0,9690
552	1	1,367	43,47	15,49	22,99	27,7215	0,9779
552	2	1,355	43,90	15,48	23,31	27,9819	0,9846
552	3	1,466	42,29	14,80	22,05	26,5564	0,9797
792	1	1,601	41,27	14,51	21,20	25,6901	0,9706
792	2	1,447	40,77	14,24	20,21	24,7229	0,9570
792	3	1,362	41,05	14,37	21,20	25,6113	0,9751
1392	1	1,180	46,41	16,25	25,24	30,0187	0,9988
1392	2	1,174	46,86	16,63	25,59	30,5189	0,9945

Continua...

Quadro – 1 B, Cont.

1392	3	1,177	46,43	16,33	25,23	30,0536	0,9964
1704	1	1,167	46,77	16,19	25,16	29,9189	0,9990
1704	2	1,154	46,91	16,33	25,34	30,1461	0,9983
1704	3	1,182	46,90	16,39	25,36	30,1954	0,9970
2184	1	1,114	47,14	16,53	25,81	30,6496	1,0012
2184	2	1,109	46,92	16,31	25,67	30,4132	1,0048
2184	3	1,127	46,76	16,37	25,54	30,3359	1,0008
3696	1	1,037	46,96	16,09	25,66	30,2874	1,0107
3696	2	1,038	47,03	16,04	25,72	30,3117	1,0132
3696	3	1,073	46,93	16,24	25,74	30,4349	1,0079
80° C							
Tempo (h)	Repetiç ão	Absorbâ ncia	L	a	b	C	H
24	1	0,912	47,37	14,91	25,68	29,6946	1,0448
24	2	0,915	47,43	15,04	25,73	29,8033	1,0418
24	3	0,922	47,22	15,23	25,59	29,7792	1,0339
48	1	0,899	47,55	14,98	25,82	29,8508	1,0451
48	2	0,896	47,64	15,07	25,91	29,9739	1,0440
48	3	0,890	47,51	14,99	25,78	29,8213	1,0441
72	1	0,880	47,75	14,78	26,02	29,9247	1,0542
72	2	0,881	47,65	14,72	25,97	29,8516	1,0551
72	3	0,875	47,60	14,72	26,00	29,8777	1,0556
96	1	0,866	47,48	14,61	25,80	29,6495	1,0555
96	2	0,855	46,84	14,39	25,37	29,1669	1,0548
96	3	0,878	46,99	14,41	25,46	29,2551	1,0558
120	1	0,863	47,04	14,42	25,48	29,2774	1,0558
120	2	0,869	47,22	14,39	25,60	29,3672	1,0587
120	3	0,890	47,52	14,73	25,89	29,7870	1,0535
144	1	0,868	46,86	13,49	25,53	28,8749	1,0847
144	2	0,848	47,49	14,63	26,02	29,8509	1,0586
144	3	0,857	46,58	14,45	25,32	29,1531	1,0522
168	1	0,857	47,25	14,56	25,65	29,4943	1,0545
168	2	0,852	47,58	14,66	25,89	29,7524	1,0556
168	3	0,842	47,28	14,50	25,70	29,5083	1,0571

Continua...

Quadro – 1 B, Cont.

336	1	0,827	47,66	14,48	25,94	29,7078	1,0617
336	3	0,821	47,71	14,31	25,86	29,5553	1,0654
408	1	0,800	47,62	14,21	25,93	29,5684	1,0695
408	2	0,779	47,67	13,94	25,91	29,4220	1,0772
408	3	0,803	47,77	14,21	26,00	29,6298	1,0706
552	1	0,750	47,75	13,91	26,00	29,4871	1,0795
552	2	0,795	47,69	14,27	26,04	29,6937	1,0695
552	3	0,750	46,65	13,23	25,47	28,7011	1,0917
720	1	0,739	47,98	13,85	26,13	29,5736	1,0834
720	2	0,715	48,22	13,78	26,41	29,7889	1,0899
720	3	0,691	48,28	13,85	26,31	29,7328	1,0862
888	1	0,754	48,04	13,81	26,12	29,5461	1,0844
888	2	0,752	48,17	13,91	26,23	29,6901	1,0832
888	3	0,758	47,97	13,79	26,06	29,4837	1,0841
1080	1	0,703	48,27	13,40	26,28	29,4991	1,0993
1080	2	0,734	48,11	13,59	26,21	29,5238	1,0925
1080	3	0,697	48,39	13,34	26,30	29,4898	1,1014

Quadro 2 B- Equações ajustadas para cada parâmetro espectrofotométrico (absorbância) e colorimétrico (L, a, b, C e H) ao longo do tempo, em horas (t), nas condições de armazenamento no escuro, luz, 40° C, 60° C e 80° C

Escuro		
Parâmetros	Equações ajustadas	R ²
ln	= -0,0000336t – 0,0155	0,66
L	= 0,0005245t + 45,7160	0,97
a	= -0,0005003t + 18,1409	0,58
b	= 0,0003492t + 24,6853	0,93
C	= 0,0000004t ² – 0,0006261t + 30,7523	0,83
H	= 0,00001985t + 0,937108	0,69
Luz		
ln	= -0,000316123t + 0,047183	0,86
L	= 0,00102981t + 45,6017	0,88
a	= -0,00169080t + 18,6834	0,93
b	= 0,0003115t + 24,6245	0,74
C	= -0,00069842t + 30,8959	0,87
H	= 0,00005205t + 0,9212	0,93
40° C		
a	= -0,000631207t + 16,7934	0,82
C	= -0,0003545t + 30,4221	0,64
H	= 0,0000173t + 0,9862	0,82
60° C		
ln	= -0,0001636t + 0,0911	0,81
L	= 0,00102981t + 40,8820	0,83
a	= -0,0007138t + 14,9113	0,65
b	= 0,0024291t + 20,8804	0,80
C	= -0,0024107t + 25,6581	0,75
H	= 0,0000276t + 0,9510	0,81
80° C		
ln	= -0,0002302t + 0,0301	0,90
L	= 0,0008997t + 47,2709	0,62
a	= -0,0012794t + 14,7763	0,81
b	= 0,00054035t + 25,7134	0,55
C	= 29,6054	-
H	= 0,0000466t + 1,0492	0,89

Quadro 3 B – Resumo da Análise de variância da regressão para valores de $\ln(A/A_0)$, “L”, “a”, “b”, “C” e “H” ao longo do tempo, em horas, de armazenagem no escuro e na luz em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$).

		Escuro					
		Quadrados Médios					
Fonte de variação	G.L.	ln	L	a	b	≠C	H
Tempo	5	0,001668 **	0,279075 **	0,426103 **	0,129423 **	0,031733 **	0,000556 **
Regressão	1	0,005577 **	1,355803 **	1,235733 **	0,602281 **	0,066261 **	0,001946 **
Falta de ajustamento	4	0,000691 *	0,009216 ^{ns}	0,223697 **	0,011209 *	0,008714 ^{ns}	0,000208 **
Resíduo (ANOVA)	12	0,000079	0,011816	0,002811	0,003677	0,004840	0,000001
		luz					
		Quadrados Médios					
Fonte de variação	G.L.	ln	L	a	b	C	H
Tempo	9	0,152043 **	1,490832 **	3,801969 **	0,162161 **	0,693248 **	0,003598 **
Regressão	1	1,263642 **	11,820924 **	31,86528 **	1,081652 **	5,437194 **	0,030201 **
Falta de ajustamento	8	0,013093 ^{ns}	0,199568 ^{ns}	0,294053 ^{ns}	0,047225 *	0,100254 ^{ns}	0,000272 ^{ns}
Resíduo (ANOVA)	20	0,013539	0,210872	0,476766	0,014266	0,144255	0,000395

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

≠ grau de liberdade 2 e 3, para a regressão e falta de ajustamento do croma armazenados no escuro, respectivamente.

Quadro 3 B – Resumo da Análise de variância da regressão para valores de $\ln(A/A_0)$, “L”, “a”, “b”, “C” e “H” ao longo do tempo, em horas, de armazenagem nas temperaturas de 40° C, 60° C e 80° C, ao abrigo da luz.

		40° C					
		Quadrados Médios					
Fonte de variação	G.L.	ln	L	a	b	C	H
Tempo	11	-	-	0,847215**	-	0,343515**	0,000641**
Regressão	1	-	-	7,723929*	-	2,437447**	0,005856**
Falta de ajustamento	10	-	-	0,159543 ^{ns}	-	0,134119**	0,000120**
Resíduo (ANOVA)	24	-	-	0,0151388	-	0,022902	0,000005
		60° C					
		Quadrados Médios					
Fonte de variação	G.L.	ln	L	a	b	C	H
Tempo	12	0,050800**	18,40603**	1,204847**	11,179810**	11,21345**	0,001560**
Regressão	1	0,497578**	483,98574**	9,465405**	109,624440**	107,96748**	0,014175**
Falta de ajustamento	11	0,010184**	3,353326*	0,453887**	2,230292**	2,417624*	0,000413**
Resíduo (ANOVA)	26	0,002249	0,470687	0,142653	0,3046118	0,434062	0,000019

Continua...

Quadro 3 B, Cont.

Fonte de variação	G.L.	80° C					
		Quadrados Médios					
		ln	L	a	b	C	H
Tempo	13	0,020134 **	0,442496 **	0,686426 **	0,179538 **	0,141793 **	0,000825 **
Regressão	1	0,235083 **	3,590754 **	7,261761 *	1,295298 **	0,086561 ^{ns}	0,009655 **
Falta de ajustamento	12	0,002149 **	0,180140 *	0,138480 *	0,086557 **	0,146395	0,000090 *
Resíduo (ANOVA)	28	0,000311	0,064614	0,057092	0,028083	0,053080	0,000037

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.
ns não significativo a 5% de probabilidade