

ALINE MANKE NACHTIGALL

**EXTRAÇÃO, SAPONIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE  
LUTEÍNA OBTIDA DE FLORES DE *Tagetes patula* L. E *Calendula  
officinalis* L.**

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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N124e  
2007

Nachtigall, Aline Manke, 1980-

Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores de *Tagetes patula* L. e *calendula officinalis* L. / Aline Manke Nachtigall. – Viçosa : UFV, 2007.  
xiii, 100f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Luteína - Extração. 2. Luteína - Análise. 3. Luteína - Efeito fisiológico. 4. Carotenóides. 5. Alimentos - Análise.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.06

ALINE MANKE NACHTIGALL

EXTRAÇÃO, SAPONIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LUTEÍNA  
OBTIDA DE FLORES DE *Tagetes patula* L. E *Calendula officinalis* L.

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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de fevereiro de 2007.

---

Prof. Afonso Mota Ramos  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho

---

Prof. Milton Nobel Cano Chauca

---

Prof. Paulo Cesar Stringheta  
(Orientador)

## AGRADECIMENTO

Ao orientador Prof. Dr Paulo César Stringheta, pela participação diária na execução deste trabalho, pelas diretrizes seguras, exigências e incansável colaboração.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio, apoio e ensinamentos.

À Professora Angela Cristina Oliveira Stringheta pela ajuda imprescindível com as flores e as sugestões de grande valia para a execução do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Pigmentos e Secagem Lígia Santana Pontes Fialho e Valério Poletto, pelo constante auxílio durante a execução das análises, solicitude, paciência e boa vontade.

Aos amigos do Laboratório de Pigmentos e Secagem, pela grande receptividade e colaboração, em especial, à Priscila Cardoso Fidélis, minha inestimável estagiária, pela forma incondicional com que se dedicou a este trabalho.

Aos funcionários do DTA, de grande importância, e que nunca mediram esforços no atendimento.

As grandes amizades conquistadas nestes quatro anos de convívio.

A João Alves Tôrres Jr., pelo amor, companheirismo, paciência e por nunca me permitir desistir das coisas.

Ao meu cunhado, Fernando Prates Bisso, pelo auxílio imprescindível na análise dos dados.

À minha família, pela força nas horas mais difíceis e o incentivo sempre presente.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação humana e acadêmica e que de alguma forma cooperaram na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

ALINE MANKE NACHTIGALL, filha de Luiz Carlos Jones Nachtigall e Vera Regina Manke Nachtigall, nasceu em Cruz Alta, Rio Grande do Sul, em 11 de janeiro de 1980.

Graduou-se Bacharel em março de 2001, em Química de Alimentos, pela Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. Obteve o título de *Magister Scientiae* em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em janeiro de 2003, pela mesma Universidade.

Em março de 2003 ingressou no curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS</b> .....	3
<b>Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde</b> .....	4
Resumo.....	4
Introdução.....	4
Luteína: química e propriedades antioxidantes.....	6
Luteína e sua importância para saúde.....	9
Fontes de luteína e seu uso em alimentos.....	18
Estabilidade da luteína.....	20
Conclusões.....	23
Abstract.....	23
Referências Bibliográficas.....	24
<b>Caracterização das flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L. como fonte de luteína</b> .....	32
Resumo.....	32
Summary .....	32
1 Introdução.....	33
2 Material e Métodos.....	35
2.1 Material.....	35
2.2 Extração e saponificação.....	36
2.3 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína.....	37
3 Resultados e Discussão.....	38
4 Conclusões.....	42
5 Referências Bibliográficas.....	42
<b>Efeito da saponificação sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	46
Resumo.....	46
Summary .....	47
1 Introdução.....	48
2 Material e Métodos.....	50

2.1 Material.....	50
2.2 Padronização do método de saponificação.....	50
2.3 Influência da saponificação sobre o teor de luteína.....	51
2.3.1 Extração do pigmento.....	51
2.3.2 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína.....	52
2.4 Delineamento Experimental.....	53
3 Resultados e Discussão.....	53
3.1 Padronização do método de saponificação.....	53
3.2 Influência da saponificação sobre o teor de luteína.....	54
4 Conclusões.....	61
5 Referências Bibliográficas.....	61
<b>Efeito do solvente extrator sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	65
Resumo.....	65
Summary .....	66
1 Introdução.....	67
2 Material e Métodos.....	68
2.1 Material.....	68
2.2 Extração e saponificação.....	68
2.3 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína.....	69
3 Resultados e Discussão.....	70
4 Conclusões.....	75
5 Referências Bibliográficas.....	75
<b>Atividade antioxidante de extratos de luteína proveniente de flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	79
Resumo.....	79
Summary .....	80
1 Introdução.....	81
2 Material e Métodos.....	83
2.1 Material.....	83
2.2 Extração e saponificação.....	83
2.3 Determinação da atividade antioxidante.....	85
2.4 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína.....	85
3 Resultados e Discussão.....	86
4 Conclusões.....	96
5 Referências Bibliográficas.....	96
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde</b> .....	4
Tabela 1 - Teor de luteína em frutas e hortaliças .....	19
<b>Caracterização das flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L. como fonte de luteína</b> .....	32
Tabela 1 - Descrição dos lotes de flores avaliados.....	36
Tabela 2 - Teores de luteína nas flores de tagetes e calêndula (mg.100 g peso seco <sup>-1</sup> ) .....	40
<b>Efeito da saponificação sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	46
Tabela 1 - Teor de carotenóides totais, expresso em mg de luteína.100 g pétalas secas <sup>-1</sup> , nos diferentes extratos cetônicos de tagetes.....	53
Tabela 2 - Teor médio de luteína (mg.100 g de pétalas secas <sup>-1</sup> ) em amostras saponificadas e não saponificadas de tagetes.....	55
Tabela 3 - Teor médio de luteína (mg.100 g de pétala secas <sup>-1</sup> ) em amostras saponificadas e não saponificadas de calêndula..	55
Tabela 4 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos não saponificados e saponificados de tagetes.....	59
Tabela 5 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos não saponificados e saponificados calêndula.....	59
<b>Efeito do solvente extrator sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	65
Tabela 1 - Teor médio de luteína nas amostras saponificadas de tagetes e calêndula (mg. 100 g de pétalas secas <sup>-1</sup> ).....	70
Tabela 2 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos saponificados de tagetes e calêndula.....	73
<b>Atividade antioxidante de extratos de luteína proveniente de flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.</b> .....	79
Tabela 1 - Valor de EC <sub>50</sub> (g.mmoles radical DPPH <sup>-1</sup> ) nos extratos não saponificados e saponificados de tagetes.....	86
Tabela 2 - Valor de EC <sub>50</sub> (g.mmoles radical DPPH <sup>-1</sup> ) nos extratos não saponificados e saponificados de calêndula.....	87
Tabela 3 - Porcentagem de inibição da oxidação do sistema β - caroteno/ác. linoléico dos extratos não saponificados e saponificados de tagetes.....	89

Tabela 4 -	Porcentagem de Inibição da oxidação do sistema $\beta$ - caroteno/ác. linoléico dos extratos não saponificados e saponificados de calêndula.....	90
Tabela 5 -	Teor médio de luteína ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e porcentagem (%) de luteína do total de carotenóides nos extratos de tagetes e calêndula.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde.....</b>	<b>4</b>
Figura 1 - Estrutura química da luteína e da zeaxantina.....	7
Figura 2 - Reação da luteína com oxigênio simplete.....	8
Figura 3 - Reações da luteína com radicais peróxido.....	8
Figura 4 - Pigmentos maculares no olho humano.....	9
Figura 5 - Alterações na visão durante o avanço da DMRI.....	11
Figura 6 - Carotenóides encontrados em olhos humanos e seus metabólitos.....	12
Figura 7 - Visão de uma pessoa com catarata.....	14
<b>Caracterização das flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L. como fonte de luteína.....</b>	<b>32</b>
Figura 1 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de tagetes e calêndula.....	38
<b>Efeito da saponificação sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.....</b>	<b>46</b>
Figura 1 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificados e saponificados de flores de <i>T patula</i> L.....	57
Figura 2 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificados e saponificados de flores de calendula.....	58
<b>Efeito do solvente extrator sob o teor de luteína em flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.....</b>	<b>65</b>
Figura 1 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de <i>T. patula</i> L.....	72
Figura 2 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de <i>C. officinalis</i> L.....	73
<b>Atividade antioxidante de extratos de luteína proveniente de flores de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Calendula officinalis</i> L.....</b>	<b>79</b>
Figura 1 - Desempenho dos extratos saponificados de tagetes (A) e calêndula (B) extraídos com tetraidrofurano, pelo teste do radical DPPH.....	88
Figura 2 - Desempenho dos extratos de tagetes (A) e de calêndula (B) não saponificados extraídos com tetraidrofurano, pelo teste do sistema emulsionado $\beta$ - caroteno/ác. linoléico.....	91
Figura 3 - Desempenho do extrato hexânico de tagetes não saponificado (A) e saponificado (B), pelo teste do sistema emulsionado $\beta$ - caroteno/ác. linoléico.....	92

## RESUMO

NACHTIGALL, Aline Manke, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Extração, saponificação e atividade antioxidante de luteína obtida de flores *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L.** Orientador: Paulo César Stringheta. Conselheiros: Afonso Mota Ramos e Helena Maria Pinheiro S'Antana.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do emprego das flores de *Tagetes patula* L. (tagetes) e *Calendula officinalis* L. (calêndula), como fontes de luteína, bem como verificar o efeito da etapa de saponificação e dos solventes extratores sobre as características das oleoresinas e seu poder antioxidante. A caracterização das flores amarelas, laranjas e marrons de tagetes e amarelas e laranjas de calêndula foi avaliada mediante comportamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por meio de espectrofotometria no visível, após extração com tetraidrofurano por 24 h e saponificação “over night” com KOH etanólico 10% (p/v). O maior teor de luteína foi verificado nas flores marrom de tagetes ( $1230,6 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), sendo significativamente superior ao encontrado nas flores de calêndulas amarela e laranja ( $29,80 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), embora estes últimos não tenham diferido das flores de tagetes amarelas ( $59,7 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Por apresentarem o maior teor de luteína em cada espécie, as flores marrons de tagetes e laranjas de calêndula foram empregadas nas demais fases do trabalho. A influência das modificações na etapa de saponificação e nos solventes extratores sobre o teor de luteína e o perfil de carotenóides dos extratos foi avaliada por meio de seu espectro no visível e comportamento em CLAE. Os extratos de luteína das flores marrom de tagetes e laranja de calêndula foram obtidos por extração a frio das pétalas secas durante 24 h com os solventes etanol, tetraidrofurano e hexano e, extração a quente com hexano realizada em aparato soxhlet com 7h de extração dinâmica, extração estática “over night” e 1h de extração dinâmica. Metade destes extratos não foi saponificada e a outra metade foi submetida a saponificação simultânea a extração com KOH etanólico 10% (p/v). Em testes preliminares, verificou-se que a saponificação e a extração realizadas conjuntamente possibilitam reduzir em ao menos 12 h a obtenção de luteína

de flores de tagetes. O efeito da saponificação sobre o perfil cromatográfico dos extratos foi observado apenas nas flores de tagetes, pelo nítido aumento na proporção de luteína acompanhado pela redução dos demais carotenóides. Com isto confirma-se a necessidade de saponificar os extratos de tagetes, ao passo que, para as flores de calêndula a saponificação não se faz necessária. Com relação ao solvente extrator, verificou-se a atuação diferenciada destes sobre as fontes estudadas. A calêndula não sofreu influência dos solventes, sendo que para o tagetes os melhores solventes extratores foram o tetraidrofurano ( $1220,0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e o hexano ( $893,9 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). O emprego da temperatura além de provocar a degradação dos pigmentos proporcionou extratos com menor pureza. O efeito da saponificação e do solvente extrator sobre a capacidade antioxidante dos extratos foram avaliados pelo teste do radical livre DPPH e pelo teste do  $\beta$ -caroteno/ ac. linoléico. A saponificação foi associada a uma redução da atividade antioxidante dos extratos, uma vez que esta capacidade estava correlacionada não só a presença de luteína, mas também, com a ação de outros compostos com atividade antioxidante. O solvente extrator afetou significativamente a capacidade antioxidante dos extratos. Os extratos que apresentaram maior capacidade de redução do radical DPPH foram os de calêndula extraídos com tetraidrofurano independente da saponificação e os de tagetes extraídos com etanol sem saponificação e o saponificado extraído com tetraidrofurano ( $0,004$ ;  $0,015$ ;  $0,044$  e  $0,068 \text{ g} \cdot \text{mmol}$  de  $\text{DPPH}^{-1}$ , respectivamente). Os extratos de tagetes e calêndula mais efetivos sobre a inibição da peroxidação lipídica foram os não saponificados extraídos com tetraidrofurano ( $72,22\%$  e  $72,97\%$ , respectivamente). Pôde-se observar com o desenvolvimento do trabalho que as fontes vegetais avaliadas têm seus extratos influenciados tanto pelo solvente, como pela temperatura, e ainda, pela execução da etapa de saponificação. A saponificação gera o aumento da concentração de luteína, mas, uma vez que, esta não é o único antioxidante presente nos extratos a sua realização acaba por reduzir o efeito protetor desses. Os resultados indicam que as flores estudadas são fontes promissoras de compostos biologicamente ativos, como a luteína, com propriedades antioxidantes que vem a auxiliar no fortalecimento do sistema imunológico e na diminuição do risco de doenças degenerativas.

## ABSTRACT

NACHTIGALL, Aline Manke, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2007. **Extractions, saponification and antioxidant properties of lutein obtained from *Tagetes patula* L. and *Calendula officinalis* L. flowers.** Advisor: Paulo Cesar Stringheta. Counselors: Afonso Mota Ramos and Helena Maria Pinheiro S'Antana.

The aim of this present study was to evaluate the availability of using *Tagetes patula* L. (african marigold) and *Calendula officinalis* L. (marigold) flowers as sources of the lutein, as well as to evaluate the effect of the saponification process and extraction solvents over the oilresins and its antioxidant powers. The characterization of the flowers yellow, orange and brown *T. patula* L. flowers, as well as the yellow and orange *C. officinalis* L. was determined by their UV-visible spectra and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The extract is obtained from a 24-hour extraction with tetrahydrofurane and saponification overnight with a solution of 10% KOH in ethanol. The highest content of lutein (means) was verified in the brown african marigold ( $1230,6 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), which was significantly higher than the values encountered in the yellow and orange marigold ( $29,80 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ). However, these content values had not differed from the yellow african marigold ( $59,7 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ). The brown african marigold and the orange marigold were the selected flowers to be carried out in the succeeding experiments since those were the ones showing the highest contents of lutein in each species. The influences of the modifications in the saponification process and extraction solvents over the contents of lutein and the carotenoid profiles of the extracts of the flowers were evaluated by UV-visible spectra and HPLC. The extracts of the lutein of the brown african marigold and the orange marigold flowers were obtained through a cold extraction of the dried petals for 24 hours, with the solvents ethanol, tetrahydrofurane, hexane and, hot extraction with hexane was also conducted by using a soxhlet apparatus in which a dynamic extraction took place for 7 hours, followed by an overnight static extraction and an extra hour of a dynamic extraction. Half of the extracts were not submitted to saponification whereas the other half was saponified, simultaneously to the

extraction, with a 10% KOH in ethanol (w/v), in a ratio of 1:1. The effect of the saponification on the profile chromatographic of the extracts was just verified in the flowers of african marigold, where a clear increase was observed in the lutein proportion accompanied by the reduction of the other carotenoids. However, when extracts of orange *C. Officinalis* L. were submitted to saponification, an increase in the lutein content was not observed whereas contents of other carotenoids actually increased. Hence, whenever working with african marigold, it is necessary to submit these flowers to saponification whereas marigold do not demand it. As far as the extraction solvent goes, it was confirmed that each one had different performances over the studied lutein sources. The marigold didn't suffer influence of the solvents, and for the african marigold the best solvents extractors were the tetrahydrofurano ( $1220,0 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) and the hexano ( $893,9 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Not only the use of temperature caused degradation of pigments but it also provided less pure extracts. The effects of the solvent extractor and of the saponification about the antioxidant capacity of the extracts were appraised for the test of the free radical DPPH and of the  $\beta$ -caroten/ac. linoleic. The saponification was associated with reducing the protection capacity of the extracts due to the oxidation effects. This capacity was not only correlated to the lutein contents, but to the influence of other antioxidants compounds as well. The extracts that presented larger capacity of reduction of the radical DPPH were the one of extracted marigold with independent tetrahydrofurane of the saponification and the one of extracted african marigold with ethanol without saponification and the extracted saponificado with tetrahydrofurane ( $0,004$ ;  $0,015$ ;  $0,044$  and  $0,068 \text{ g} \cdot \text{mmol}$  of  $\text{DPPH}^{-1}$ , respectively). Saponification had no affect on the results of these former extracts. The african marigold extracts and more effective marigold about the inhibition of the peroxidation lipidic were the not saponification extracted with tetrahydrofurane ( $72,22\%$  and  $72,97\%$ , respectively). It can be noticed that the plant sources analyzed in this study have their extracts highly influenced not only by the solvents and temperature but to saponification processes as well. The saponification stimulates an increase of the lutein concentration in the extracts. However, since lutein is not the only existent antioxidant substance in the extracts, the conduction of saponification processes tend to reduce the of protective antioxidant ability

they possess. The results of this study indicate that the analysed flowers are promising sources of biological active compounds, such as lutein, which contain antioxidants properties that assist in the strengthening of the immunologic system as well as reduce the risks of developing degenerative diseases.

## INTRODUÇÃO GERAL

Com o aumento da preocupação com a saúde e a qualidade de vida, tem-se notado uma preferência por alimentos contendo ingredientes naturais e com características benéficas a saúde. Nesse contexto, os carotenóides se destacam devido as suas múltiplas funções. Além de conferirem aos alimentos uma ampla variedade de cores, que vão do amarelo até o vermelho, os carotenóides também apresentam algumas propriedades funcionais [7, 8].

A luteína, carotenóide diidroxilado, é um potente antioxidante que atua protegendo os tecidos dos danos causados por radicais livres [8, 9]. Além de prevenir a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), a luteína destaca-se na prevenção da aterosclerose, da catarata, da retinopatia diabética, da retinite pigmentosa, do câncer e de outras doenças [1, 2, 3, 4, 10].

Dados recentes do Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimam que aproximadamente 2,9 milhões de brasileiros, com mais de 65 anos de idade, apresentam casos de degeneração macular relacionada à idade (DMRI), doença ocular grave e irreversível que causa cegueira em pessoas na faixa etária a cima de 65 anos. Com o aumento da expectativa de vida, é natural que este número se eleve daí a importância de uma nutrição adequada [6]. Já que estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada ao consumo de alimentos ricos neste carotenóide, como frutas e hortaliças de folha verde [8, 9, 10].

Visto que os seres humanos não possuem capacidade de sintetizar antioxidantes para a neutralização de radicais livres, estes devem ser supridos pelo consumo de alimentos e/ou suplementos alimentares. A adição de carotenóides em formulações alimentícias tem sido comum na indústria.

Durante o processamento de alimentos o conteúdo de luteína pode ser significativamente reduzido, provocando um decréscimo de sua biodisponibilidade. Este fato reforça a necessidade de suplementação alimentar, bem como, justifica os estudos de otimização do processo de

extração de luteína, de forma a reduzir ao mínimo sua atividade antioxidante, possibilitando o emprego de ésteres de luteína como aditivos em alimentos com alegações funcionais [5].

As flores são exemplos de fontes que podem ser empregadas para a obtenção de carotenóides, visando a suplementação alimentar, cuja produção comercial é restrita a poucas espécies. Apenas as flores de *Tagetes erecta* L. são cultivadas comercialmente como fonte de luteína. No entanto, se considerarmos a grande variedade de flores na natureza, e ainda, a capacidade destas em biossintetizar vários tipos de carotenóides, torna-se interessante a investigação dos carotenóides presentes nestas espécies, uma vez que novas fontes destes pigmentos podem ser detectadas.

Com base no exposto, o presente trabalho objetivou verificar a viabilidade do emprego de flores de *Tagetes patula* L. (tagetes) e *Calendula officinalis* L. (calêndula) como fonte de luteína, bem como, avaliar a influência das modificações na etapa de saponificação e no solvente extrator sob o perfil de carotenóides e a atividade antioxidante dos extratos de luteína obtidos destas flores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicol. Let.**, n. 150, p. 57-83, 2004.
2. BROW, L.; et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **Am. J. clin. Nutr.**, n. 70, p. 517-524. 1999.
3. CHASAN-TABER, L.; et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. clin. Nutr.**, n. 70, p. 509-516. 1999.
4. DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T.M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optomet.**, n. 71, p. 147-164. 2000.
5. DELI, J.; et al. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, n.14, p. 925–928, 2004.
6. LAJOLO, F. **Zeaxantina e luteína reduzem riscos de degeneração macular**. Disponível em: A:\Nutrição em Pauta - O Site do Profissional de Nutrição.htm. Acesso em: 01 jun. 2004.
7. PEREIRA, A.S. **Teores de carotenóides em cenoura (*Daucus carota* L.) e sua relação com a coloração das raízes**. 2002. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
8. SCHALCH, W. **A Importância dos carotenóides**. Disponível em: A:\Nutrição em Pauta - O Site do Profissional de Nutrição.htm. Acesso em: 01 jun. 2004.
9. SILVA, A. S. Luteína, alimento para tu vista. **Food Ingred.**, p. 80-81, 2004.
10. SUMANTRAN, V.N.; et al. Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. **Canc. Epidemiol. Biomarker Prev.**, v. 9, p. 257-263. 2000.
11. STRUNCH, S. S. **La luteína: el antioxidante para los ojos que envejecen**. Disponível em: <http://retinosis.org/articulo.php?sec=medicina&doc=luteina.htm>. Acesso em: 19 mai. 2004.

## **LUTEÍNA: PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BENEFÍCIOS À SAÚDE\***

RESUMO: Este trabalho constitui uma revisão de dados científicos sobre luteína e sua ação antioxidante. A luteína é um carotenóide capaz de dissipar a energia dos radicais livres e seqüestrar o oxigênio singlete. Radicais livres agem continuamente no organismo, podendo desencadear danos celulares e serem os responsáveis pelo desenvolvimento de câncer e certas doenças crônicas. Estudos mostram que a luteína protege moléculas de lipídios, membranas protéicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra o ataque dos radicais, tendo um papel essencial na proteção de doenças, notadamente na redução do risco da degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Como prevenção, preconiza-se o consumo de dietas com alimentos ricos em luteína como vegetais de folhas verdes. A luteína ingerida diariamente pelos consumidores brasileiros é um importante componente bioativo, que pode também ser utilizado como um não nutriente, em alimentos com alegações de propriedades funcionais.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante; carotenóides; luteína; degeneração macular.

### **Introdução**

Compostos naturais, contendo duplas ligações conjugadas, atuam por seu efeito antioxidante na eliminação de radicais livres. Um exemplo desses compostos são os carotenóides da dieta ou de formulações medicamentosas, que podem desempenhar efeito benéfico no organismo humano pelo seqüestro e extinção destes radicais.<sup>24</sup>

A correlação entre altos níveis plasmáticos de carotenóides e benefícios à saúde apareceu na literatura na década de 70. As dietas ricas em frutas e legumes

---

\* Artigo enviado à Revista Alimentos & Nutrição em 23 de maio de 2006.

estavam associadas a reduzidas taxas de câncer e doenças coronárias. Como consequência, a população foi encorajada a consumir ao menos 5 porções de frutas e hortaliças diariamente, equivalente a aproximadamente 6 mg de carotenóides.<sup>25</sup> Desde então, esta correlação tem sido avaliada e confirmada por uma série de autores.<sup>9, 13, 17, 21, 23, 48, 66</sup>

Estudando os benefícios dos carotenóides à saúde, Bakó et al.<sup>8</sup> afirmaram que além de precursores da vitamina A, estes pigmentos apresentam outras funções fisiológicas, tais como prevenção de determinados tipos de câncer, ação inibidora nas mucosas de úlceras gástricas, capacidade de prevenir a fotossensibilização em certas doenças de pele, aumento da resposta imunológica a determinados tipos de infecção e propriedades antienvhecimento.

A luteína, carotenóide macular de pigmentação amarela, é um potente antioxidante que previne danos causados por radicais livres nos tecidos.<sup>3, 52, 58</sup> Segundo Dagnelie et al.<sup>20</sup>, este pigmento protege os fotoreceptores foveais ao filtrar a luz azul prejudicial à mácula, reduzindo em 40% a incidência desta à retina. A perda da sensibilidade visual, ocorrida em pessoas com idade avançada e baixa densidade do pigmento macular nos tecidos oculares, pode ser a precursora de algumas doenças dos olhos, incluindo a degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da DMRI, destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças.<sup>3, 15, 17, 20, 21, 28, 63</sup>

Estudos realizados com animais e humanos demonstram que a concentração de luteína no sangue e nos tecidos está estreitamente relacionada com o consumo de alimentos ricos neste carotenóide, tais como frutas e hortaliças de folhas verdes.<sup>52, 59</sup>

Tendo-se conhecimento da importância da luteína na defesa do organismo contra doenças degenerativas e que sua capacidade protetora está intimamente relacionada ao seu consumo, o objetivo do trabalho foi compilar informações atualizadas da literatura sobre a luteína.

### **Luteína: Química e Propriedade Antioxidante**

A luteína, carotenóide diidroxilado pertencente a classe das xantofilas de coloração amarela, <sup>32</sup> atua como antioxidante protegendo as células dos danos oxidativos. Conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o estresse oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças. <sup>23, 45, 46, 50, 52, 59</sup>

O número de duplas ligações conjugadas afeta a coloração e a capacidade antioxidante do carotenóide. Porém, a atividade antioxidante é afetada pela dupla conjugada do anel, ao contrário da coloração em que a ciclização reduz a intensidade da cor. <sup>39, 56</sup> De acordo com Shami & Moreira, <sup>53</sup> a ação seqüestrante de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenóides. Segundo Mello, <sup>39</sup> para apresentar função como antioxidante e apresentar proteção máxima, os carotenóides devem possuir no mínimo nove ligações duplas conjugadas.

A luteína e a zeaxantina apresentam estruturas químicas similares tornando difícil distinguí-las analiticamente. Ambas possuem o mesmo número de ligações duplas na cadeia, porém há uma diferença na posição de uma dessas duplas ligações no anel (Figura 1). Essa diferença faz da zeaxantina um melhor antioxidante por apresentar uma dupla ligação conjugada a mais do que a luteína. <sup>32</sup>

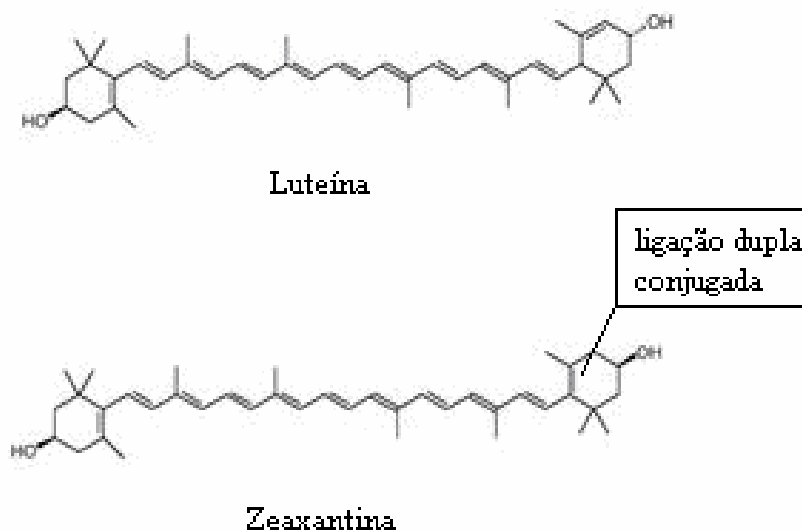


FIGURA 1 – Estruturas químicas da luteína e da zeaxantina.

A atividade antioxidante da luteína consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos.<sup>46, 59</sup> Por exercer funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueia os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas.<sup>53</sup>

El-Agamey et al.<sup>23</sup> afirmaram que as propriedades antioxidantes dos carotenóides são atribuídas à sua estrutura, pela presença de elevado número de duplas ligações alternadas. Estas permitem a absorção da energia das espécies reativas do oxigênio (EROs), canalizando-a através da longa cadeia de duplas ligações que se encontram em ressonância. A energia é finalmente liberada na forma de calor, regenerando a molécula de carotenóide ao seu estado inicial.<sup>59</sup>

Desta forma, o princípio da proteção conferida pela luteína contra reações de fotossensibilização baseia-se num mecanismo de transferência de energia, que devolve o oxigênio singlete ao seu estado basal. O retorno da luteína triplete ao seu

estado original, pela dissipação de energia na forma de calor, torna possível a reação com outro oxigênio singlete (Figura 2).<sup>24, 32, 59</sup>

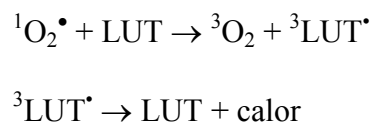


FIGURA 2 - Reação da luteína com oxigênio singlete.

As reações em cadeia dos radicais peróxidos podem ser interrompidas pelos carotenóides através de três possíveis mecanismos: por transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou por adição (Figura 3).<sup>23, 59</sup> De acordo com Fontana et al.,<sup>24</sup> sob uma tensão adequada de oxigênio o curso das reações se completa.

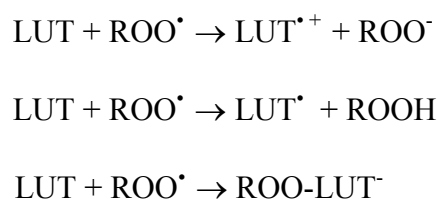


FIGURA 3 – Reações da luteína com radicais peróxidos.

A concentração de oxigênio gera um efeito significativo na atividade antioxidante dos carotenóides. Em baixas concentrações de oxigênio os carotenóides apresentam comportamento antioxidante e caráter pro-oxidante em concentrações elevadas.<sup>23</sup>

A estrutura, a polaridade média e a reatividade dos carotenóides devem ser consideradas ao avaliar sua capacidade antioxidante.<sup>23</sup> Medidas via fotoemissão indicam que a capacidade de seqüestro de oxigênio singlete por parte de carotenos e

xantofilas é máxima para o licopeno, alta para astaxantina ou cantaxantina, intermediária para  $\beta$ -caroteno ou bixina e menor para luteína e crocina.<sup>24</sup>

O local e orientação dos carotenóides nas membranas biológicas dependem da sua estrutura, como consequência sua habilidade em eliminar radicais livres é afetada. A característica apolar dos carotenos inviabiliza termodinamicamente a transferência de elétrons na membrana celular, no entanto as xantofilas, como a luteína e a zeaxantina, pelo caráter mais polar, são capazes de atravessar a membrana e interceptar os radicais em regiões aquosas na superfície da membrana.<sup>23</sup>

### **Luteína e sua Importância para Saúde**

No centro da retina, região de elevada acuidade visual, é possível a visualização de uma mancha amarela chamada mácula, pigmento da retina responsável pela visão nítida das imagens (Figura 4). Sua cor amarela se deve a presença de luteína e zeaxantina, os dois únicos carotenóides presentes no olho, em quantidade muito maior do que em qualquer outro tecido humano.<sup>65</sup>



FONTE: Alves-Rodrigues & Shao.<sup>3</sup>

FIGURA 4 – Pigmentos maculares no olho humano.

Cientistas acreditam que o pigmento da mácula protege a retina. A densidade do pigmento na mácula tem sido usada como parâmetro para uma vida saudável. De forma seletiva, a mácula concentra luteína e zeaxantina em uma fina camada de tecido retiniano que cobre essa área do olho.<sup>32</sup>

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular grave capaz de causar cegueira nas pessoas com mais de 65 anos.<sup>55</sup> A DMRI atinge a capacidade visual, causando redução da clareza visual, podendo ainda resultar em rápida e dramática perda da visão. É por esta razão que a DMRI tem despertado grande atenção por parte dos profissionais da área da saúde.<sup>16, 59</sup>

Esta doença afeta cerca de 30 milhões de pessoas no mundo todo. É responsável por 50% dos casos de cegueira no Reino Unido e é a maior causa de cegueira a partir dos 50 anos nos Estados Unidos.<sup>45</sup> Segundo Schalch,<sup>52</sup> estima-se que no Brasil exista cerca de 1 milhão de casos de DMRI. No entanto, dados recentes do Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimam que aproximadamente 2,9 milhões de brasileiros, com mais de 65 anos, apresentam casos de degeneração macular.<sup>30</sup> O mais importante é que, com o aumento da expectativa de vida, este número tende a crescer. Resultados de diferentes estudos mostram que a prevalência de DMRI assume um comportamento exponencial a partir dos 55-60 anos.<sup>30, 45</sup>

À medida que as células da mácula se deterioram, a acuidade visual começa a ser alterada. Os objetos na frente começam a mudar de forma, tamanho ou cor e parecem se movimentar ou mesmo desaparecem. Eventualmente a DMRI evolui para uma área de cegueira, no centro do campo visual, o que não permite ver as imagens centrais (Figura 5). No entanto sua visão periférica fica preservada, fato pelo qual a DMRI é conhecida como visão periférica.<sup>32</sup> Quando a perda de visão é grande em

ambos os olhos, os pacientes apresentam uma enorme redução da independência e da qualidade de vida.<sup>28</sup>



FONTE: DSM Nutritional Products.<sup>36</sup>

FIGURA 5 - Alterações na visão durante o avanço da DMRI.

A DMRI pode apresentar-se de duas formas, DMRI seca ou não-neovascular e DMRI úmida ou neovascular. Na degeneração do tipo seca, a parte central da retina começa a ficar distorcida, pigmentada ou afilada. Na degeneração úmida, a retina pode desaparecer e não poderá ser recuperada, dando a impressão de existir um buraco no centro da retina.<sup>32</sup>

O mecanismo de proteção da retina pela lúteína e zeaxantina deve-se à limitação do estresse oxidativo e à capacidade destas em filtrar a luz azul danosa aos tecidos. De acordo com Bone et al.<sup>13</sup> e Deli et al.<sup>21</sup>, a luteína e a zeaxantina absorvem 20-90% da luz azul incidente na retina, reduzindo a extensão do dano fotooxidativo. Os pigmentos maculares estão diretamente envolvidos na quebra das etapas de propagação da oxidação dos radicais peróxidos e interceptação do oxigênio singlete.<sup>5,21</sup>

A luz azul na retina gera EROS que encabeçam a peroxidação das membranas lipídicas. A presença de produtos de oxidação da luteína na mácula são indícios de sua capacidade em atuar como antioxidante, protegendo os olhos dos danos da luz azul, justamente pela organização do sistema retiniano onde a luz passa primeiro por

altas concentrações de luteína e zeaxantina antes de atingir os cones e bastonetes.<sup>4, 11,</sup>

61

A relação entre a baixa concentração de luteína e zeaxantina na região ocular e o maior risco de DMRI é citada por diversos autores.<sup>11, 12, 13, 26, 66</sup> Da mesma forma, os altos níveis de carotenóides na mácula (Figura 6) associados à redução da ocorrência de DMRI tem sido motivo de estudo de inúmeros trabalhos.<sup>3, 10, 20, 26, 30, 47</sup> Carvalho,<sup>16</sup> em estudos *pos-mortem*, verificou que a redução da densidade de luteína e zeaxantina na mácula pode ser observada à medida que a degeneração macular progride. Por ser irreversível, a prevenção da DMRI com o consumo de luteína e zeaxantina é muito importante.

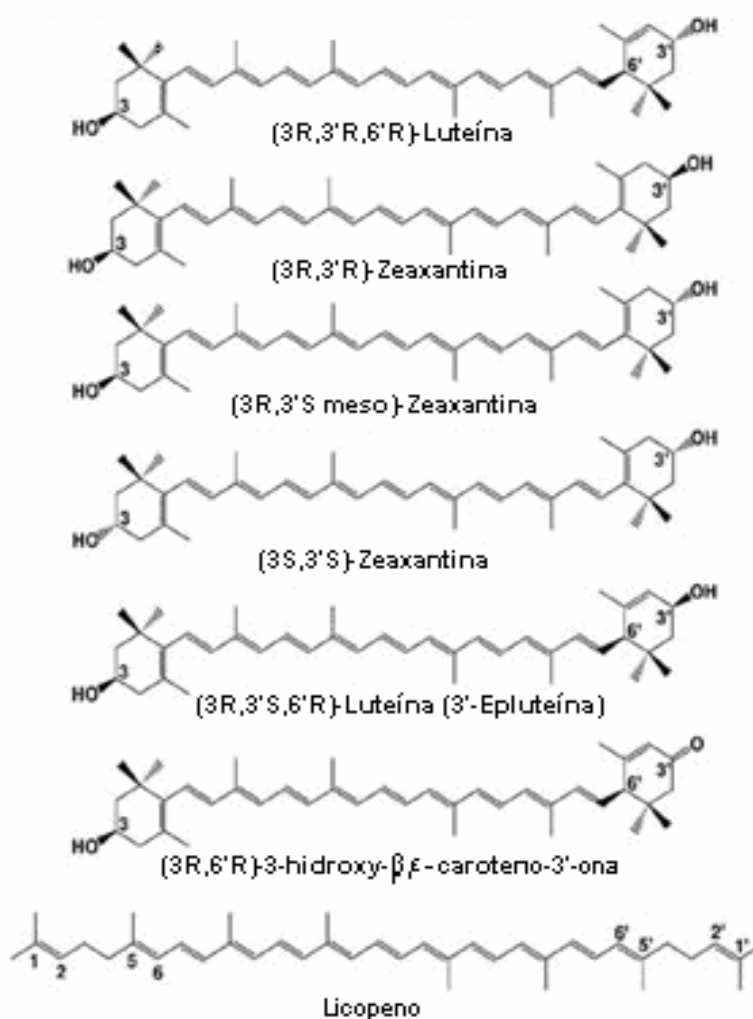


FIGURA 6 – Carotenóides encontrados em olhos humanos e seus metabólitos.

Hammond et al.<sup>26</sup> afirmaram que o tipo de dieta, se rica em gorduras ou fibras, influencia os níveis de pigmentos na mácula, sendo que a gordura facilita a absorção da luteína, ao passo que as fibras reduzem a mesma. Segundo Dagnelie et al.,<sup>20</sup> a suplementação com 40 mg.dia<sup>-1</sup> de luteína pode melhorar a acuidade visual e aumentar o campo de visão central de pacientes com DMRI. De acordo com Landrum & Bone<sup>31</sup> e Kruger et al.,<sup>29</sup> a suplementação eleva a pigmentação macular em 20-40%.

Koh et al.<sup>27</sup> avaliaram o efeito de uma suplementação diária de 20 mg de luteína em pacientes com e sem DMRI, em termos de densidade óptica do pigmento na mácula e concentrações de luteína no plasma. Os autores verificaram aumento da concentração do pigmento tanto na mácula como no plasma.

Estudos envolvendo o fumo e a DMRI foram desenvolvidos por Seddon et al.<sup>54</sup> e Beatty et al.<sup>9</sup> Nestes estudos, os autores verificaram que o aumento da frequência do tabagismo estava associado a uma menor densidade dos pigmentos na mácula. Alberg<sup>1</sup> verificou que a concentração de luteína e zeaxantina no plasma era 14% menor em indivíduos fumantes comparados a indivíduos não fumantes.

Já é conhecido o fato de que a suplementação com altas doses de  $\beta$ -caroteno em fumantes e indivíduos expostos a asbestos pode levar ao aumento de incidências de câncer de pulmão.<sup>28</sup> No entanto, não existem dados sugerindo que os carotenóides sem atividade pró-vitáminica, como a luteína e zeaxantina, aumentem o risco de câncer neste órgão, nem tampouco, da associação da luteína com os casos de câncer de pulmão em indivíduos expostos a abestos. Richer<sup>47</sup> afirma ainda que, embora luteína e zeaxantina tenham relação com o  $\beta$ -caroteno, não existe nenhuma evidência para interconversão de  $\beta$ -caroteno em luteína ou zeaxantina.

Assim como para a DMRI, a suplementação alimentar com luteína tem apresentado efeitos positivos no controle da catarata e de outras doenças oculares como a retinopatia diabética e a retinite pigmentosa.<sup>2, 3, 15, 37, 41, 43</sup> Segundo Alves-Rodrigues & Shao,<sup>3</sup> o risco de cataratas é significativamente menor quando há um consumo elevado de frutas e hortaliças ricas em luteína e zeaxantina.

A alteração mais freqüente do cristalino é a opacificação, denominada de catarata. A doença pode ter várias etiologias como traumática, congênita, por uso de medicamentos, inflamatória, entre outras. Porém, a causa mais comum de catarata é aquela relacionada à idade, também denominada catarata senil. Estima-se que mais de 50% das pessoas acima de 60 anos e algumas mais jovens sofrem de catarata. A catarata, como já mencionado, é a turvação progressiva do cristalino, interferindo na absorção da luz que chega a retina, causando uma visão progressivamente borrada (Figura 7).<sup>20</sup> A incidência de cataratas aumenta sensivelmente com a idade. Segundo Olmedilla et al.<sup>44</sup>, ao redor do mundo há cerca de 30-50 milhões de casos da doença. No Brasil, na década de 90, foram reportados 350 mil casos de cegueira em consequência da catarata.<sup>33</sup>



FONTE: DSM Nutritional Products.<sup>36</sup>

FIGURA 7 - Visão de uma pessoa com catarata.

A retinopatia diabética é a causa de cegueira mais freqüente em países industrializados. Depois de 20 anos de diabetes, praticamente todos os pacientes com diabetes tipo I e mais de 60% dos pacientes com diabetes tipo II têm algum grau de retinopatia. Acredita-se que problemas comuns aos diabéticos, como uma maior produção de radicais livres e a diminuição nos sistemas de defesa antioxidante, podem ter uma grande importância no desenvolvimento da retinopatia diabética. Baseado neste fato, pesquisadores têm focado seus experimentos em novas vias de tratamento, como o uso do antioxidante luteína.<sup>41</sup>

O diabetes pode causar dois tipos de alterações: a retinopatia não proliferativa e a retinopatia proliferativa. Na retinopatia não proliferativa, pequenos capilares da retina rompem extravasando sangue, sendo que nos estágios iniciais não causa cegueira. As pequenas hemorragias retineanas podem distorcer partes do campo visual ou, quando se localizam próximas da mácula, podem borrar a visão. Na retinopatia proliferativa, a lesão da retina estimula o crescimento de novos vasos sangüíneos. Estes crescem anormalmente, acarretando a formação de cicatrizes, sangramento no interior da cavidade vítrea e, algumas vezes, o descolamento de retina. A retinopatia proliferativa é mais prejudicial à visão que a não proliferativa e pode levar à cegueira total.<sup>35</sup>

A retinite pigmentosa é uma degeneração ocular rara, caracterizada pela atrofia dos fotorreceptores da retina responsáveis pela visão em condições de baixa luminosidade. Assim, os portadores de tal disfunção apresentam visão noturna prejudicada. Ao longo do tempo ocorre uma perda gradual da visão periférica. Nos estágios mais avançados, o indivíduo apresenta uma pequena área central de visão e pouca visão periférica remanescente (visão em túnel). Seu tratamento é limitado, no

entanto, existem evidências de que a suplementação com luteína e a zeaxantina retarda o progresso degenerativo e melhora a acuidade visual.<sup>2, 37, 43</sup>

A retinite pigmentosa pode ser típica ou se apresentar associada a outras enfermidades oculares, ao diabetes, a problemas metabólicos como obesidade, e mesmo pelo uso abusivo e indevido de medicamentos. A enfermidade foi mencionada pela primeira vez em 1744. Hoje, já afeta 4% da população mundial. Só no Brasil existem cerca de 6 milhões de pessoas com a doença.<sup>43</sup>

Além da atuação nas doenças oculares, a luteína destaca-se também pela prevenção do câncer, da aterosclerose e de outras doenças.<sup>3, 15, 17, 20, 21, 28, 63</sup>

O processo carcinogênico é caracterizado por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção. Além disso, a fase de iniciação está associada com dano irreversível no material genético da célula, muitas vezes devido ao ataque de radicais livres. Desse modo, os antioxidantes poderiam reduzir o risco de câncer inibindo danos oxidativos no DNA, sendo portanto considerados como agentes potencialmente quimiopreventivos. Entre estes agentes está listada a luteína.<sup>57</sup>

Segundo Dagnelie et al.,<sup>20</sup> a luteína apresenta propriedades anti-apoptose *in vitro*, que auxiliam na prevenção de câncer de fígado, cólon entre outros. De acordo com Fraser & Bramley,<sup>25</sup> os carotenóides *in vitro* inibem a proliferação e a transformação celular, a formação de micronúcleos, bem como a modulação da expressão de certos genes. A luteína e a zeaxantina protegem as células contra danos no DNA, estimulam a comunicação das células gap e reduzem o risco de câncer.<sup>34, 63, 67</sup> Estudos comprovam que o consumo de luteína está inversamente associado com o câncer de cólon em homens e mulheres.<sup>25</sup> Em mulheres com elevado consumo de luteína associado a ômega 3 verificou-se uma redução de 59-64% neste tipo de câncer.<sup>6</sup>

Marcada pela formação de placas de gordura que impedem a passagem do sangue, a aterosclerose em geral é fatal quando afeta as artérias do coração ou do cérebro. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que evolui com formação de placas no interior das artérias, os denominados ateromas. Estes ateromas levam à oclusão do vaso e à instalação de várias síndromes isquêmicas graves (infarto do miocárdio, ictus cerebral, gangrena de membros, etc). Acredita-se que a primeira lesão estrutural na aterogênese é a "estria gordurosa", que consiste no acúmulo, sob o endotélio, de células de ésteres de colesterol ("células espumosas"), cercadas por depósitos de lipídios.<sup>22</sup>

Sabe-se que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), quando oxidadas, danificam o endotélio, por conseguinte, a ação antioxidante dos carotenóides, nos quais se inclui a luteína, protegeria o endotélio da ação destas lipoproteínas.<sup>3</sup> As lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de injúria ao endotélio normalmente causada pelas LDL oxidadas. Os carotenóides são captados neste processo e impedem esta oxidação.<sup>23</sup>

Fraser & Bramley<sup>25</sup> e Southon & Faulks<sup>59</sup> sugerem que o efeito protetor dos carotenóides, no desenvolvimento de doenças cardíacas, está associado à redução da oxidação da LDL, do estresse oxidativo e da formação de plaquetas. No sangue, as maiores portadoras de luteína e zeaxantina são as lipoproteínas de alta densidade (HDL), enquanto os carotenos são preferencialmente carregados pelas (LDL).<sup>66</sup>

Em um estudo verificou-se que o aumento da dose de luteína reduz a interação do LDL com os monócitos. Em camundongos, a suplementação da dieta com luteína diminuiu em 43% as lesões ateroscleróticas. Os autores afirmam que a ingestão aumentada de luteína atua protegendo o organismo do desenvolvimento da aterosclerose precoce.<sup>19</sup>

Luteína extraída de flores de tagetes inibiram a atividade mutagênica de 1-nitropireno em *Salmonella typhimurium*, provavelmente pela formação de um complexo entre a luteína e o 1-nitropireno, o qual poderia limitar a biodisponibilidade deste último.<sup>38</sup> Em outro estudo a luteína de extratos de tagetes suprimiu o crescimento de tumores mamários e realçou a proliferação de linfócitos em ratos.<sup>18</sup>

### **Fontes de luteína e seu uso em alimentos**

Os carotenóides da dieta humana são principalmente encontrados em plantas, estando localizados nas raízes, folhas, brotos, frutos, flores e, em menores extensões, podem ser encontrados em produtos avícolas e derivados de algas. Em frutas e hortaliças pode ocorrer variação de 4 a 20 carotenóides em um único produto.<sup>49</sup>

A luteína é abundantemente encontrada em hortaliças de folhas verdes, principalmente nas de folhas escuras, como espinafre, couve, agrião e brócolis. Em menor quantidade pode ser encontrada em frutas e hortaliças tais como kiwi, laranja, milho, couve-de-bruxelas, pimenta entre outros.<sup>32</sup> Constitui um dos carotenóides principais dos frutos tropicais camu-camu e pequi.<sup>7</sup>

Nachtigall<sup>42</sup> estudando o teor de luteína em vegetais consumidos em Minas Gerais (Brasil) verificou que as hortaliças acelga (*Beta vulgaris*), agrião (*Nasturtium officinale*), azedinho (*Taraxacum officinale Webber ex F.H. Wigg*), brócolis (*Brassica oleracea var itálica*), couve (*Brassica oleracea car acephala*), espinafre (*Tetragonia expansa*), mostarda (*Brassica juncae*) e rúcula (*Eruca sativa*) são fontes ricas desse carotenóide (Tabela 1). A concentração encontrada em hortaliças não convencionais e de consumo regionalizado como no lobrobô (*Pereskia aculeata*), também conhecido como ora-pro-nobis, na serralha (*Sonchus oleraceus*), no almeirão

(*Cichorium intybus*) e na taioba (*Xanthosoma sagittifolium*) surpreenderam. Por outro lado, as hortaliças repolho (*Brassica oleracea var capitata*), quiabo (*Hibiscus esculentis*), pimentão (*Capsicum Annuum*), vagem (*Phaseolus vulgaris*) e jiló (*Solanum gilo*) não podem ser consideradas fontes de luteína.

TABELA 1 - Teor de luteína em frutas e hortaliças

<b>Alimento</b>	<b>Luteína (mg.100 g<sup>-1</sup>)</b>
Abóbora	2,40
Acelga	4,15
Agrião	0,70-5,27
Alface	0,17- 0,30
Almeirão	0,50-3,56
Azedinho	2,14
Brócolis	1,31-2,59
Couve	7,89-15,00
Ervilha	0,72
Espinafre	3,53-9,20
Jiló	0,10
Laranja	0,35
Lobrobô	4,83
Milho	0,02
Mostarda	4,30
Nectarina	0,02
Papaia	0,02
Pêssego	0,02
Pimentão amarelo	0,46
Pimentão verde	0,51
Pimentão vermelho	0,77
Quiabo	0,89
Repolho	0,09
Rúcula	7,18
Salsa	1,10
Serralha	5,44
Taioba	3,17
Tangerina	0,07
Vagem	0,42

FONTE: Carvalho <sup>16</sup> Nachtigall <sup>42</sup>

Os teores de luteína nas frutas e hortaliças podem variar dependendo da parte da planta analisada, estágio de maturação, condições climáticas, manejo pós-colheita, variedade e espécie analisada.<sup>49</sup>

De acordo com Alves-Rodrigues & Shao,<sup>3</sup> a luteína pode ser empregada na indústria de alimentos funcionais, para enriquecimento de produtos de frutas, bebidas lácteas, cereais, biscoitos, molhos e sopas. Como corante natural, pode ser utilizada para colorir alimentos como óleos comestíveis, margarina, maionese, mostarda, molhos de salada, iogurte, bolos, sorvete e produtos lácteos.<sup>60</sup>

A luteína pode ser empregada em alimentos na forma de microemulsões, as quais podem servir como um eficiente veículo de transporte, o que vem a reduzir problemas de solubilidade, e viabilizar o emprego deste carotenóide em bebidas com características translúcidas.<sup>5</sup>

Estudos toxicológicos têm confirmado que a luteína é segura, sendo considerada substância GRAS. O enriquecimento de alimentos pode ser realizado com êxito sem que ocorram mudanças nos demais ingredientes e sem nenhum impacto às propriedades sensoriais do produto final.<sup>3, 20, 29</sup> Assim, a ingestão de alimentos enriquecidos com luteína pode elevar o consumo diário de luteína a níveis suficientes para redução das doenças degenerativas.<sup>3</sup>

### **Estabilidade da Luteína**

O extensivo sistema de duplas ligações conjugadas é uma característica distintiva que dá aos carotenóides propriedades e funções especiais.<sup>25</sup> Esta estrutura altamente insaturada torna estes pigmentos sensíveis ao oxigênio, à luz e ao calor.<sup>64</sup>

Os carotenóides encontrados nos alimentos são geralmente *all-trans*. Mono e diepóxidos são formados pela oxidação do anel terminal dos carotenóides. A forma

*all-trans* é, freqüentemente, sujeita a isomerização transformando-se no isômero *cis*. Esta mudança de configuração pode apresentar um efeito significativo nas propriedades físicas e bioquímicas dos carotenóides.<sup>32</sup>

A luteína na natureza apresenta-se como uma mistura das formas *trans* (60%-90%) e *cis* (10-40%), apresentando maior estabilidade na conformação *trans*.<sup>60</sup> Os isômeros *cis* da luteína apresentam coloração menos intensa quando comparado aos isômeros *trans*.<sup>39</sup>

A estrutura básica dos carotenóides pode ser modificada por ciclização, migração das duplas ligações, introdução de grupos substituintes, hidrogenação parcial, dehidrogenação, extensão ou encurtamento da cadeia, rearranjos, isomerização ou combinações, o que acaba por resultar em um grande número de estruturas químicas.<sup>49</sup>

Praticamente todos os carotenóides sofrem desidratação, isomerização, e finalmente decomposição quando sujeitos a ação ácida. Isomerização por ação ácida é verificada, particularmente, no caso de carotenóides com grupamento 5,6-epóxido, que são quantitativamente transformados em 5,8-epóxido. Esta transformação pode ser prevenida acrescentando bicarbonato de sódio durante a maceração e a extração. Em contraste, a maioria dos carotenóides é, consideravelmente, estável à ação de álcalis, tanto é que a saponificação é um procedimento rotineiro na análise de carotenóides, visando eliminar materiais lipídicos e clorofilas ou hidrolisar ésteres de xantofilas.<sup>40</sup>

A estabilidade da luteína varia amplamente no processamento e na estocagem, dependendo da temperatura, da disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, atividade de água, umidade, acidez, presença de metais, peróxidos, lipoxigenases, antioxidantes e pro-oxidantes.<sup>14</sup> No entanto, é bastante estável em

solução ou suspensão de óleos vegetais, especialmente na presença de antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol, ou ainda na forma microencapsulada.

Na tentativa de evitar a oxidação dos carotenóides, surgem a cada dia novos produtos e tecnologias. Entre as tecnologias em ascensão destaca-se a de microencapsulamento, a qual pode prevenir ou diminuir a oxidação dos carotenóides presentes nos alimentos, além de possibilitar a dispersão dos pós em água.<sup>51</sup>

Nas frutas e hortaliças intactas, a estrutura celular e a complexação com proteínas conferem aos carotenóides certa estabilidade. Durante as várias etapas do processamento esta estrutura e os complexos podem ser quebrados, expondo os pigmentos a fatores adversos e a sua destruição. Quando ocorre a ruptura dos tecidos a luteína é exposta aos produtos da peroxidação dos lipídios e as lipoxigenases, podendo ocorrer rápida perda de coloração e função biológica em consequência de sua degradação.<sup>14</sup>

Segundo Sowbhagya et al.,<sup>60</sup> a luteína é estável em ampla faixa de pH, a qual pode variar de 3 a 9. Em pH extremo e na presença de luz, sofre isomerização com consequente perda de coloração. Deli et al.,<sup>21</sup> afirmam que o pigmento em meio ácido pode ser convertido em 3'-epiluteína e anidroluteína, esta conversão é passível de ocorrer também durante o processamento dos alimentos.

Aman et al.<sup>4</sup> verificaram um decréscimo de 26% e 17% no conteúdo total de luteína em milhos e espinafres após o cozimento, ao passo que o teor de cis isômeros de luteína e zeaxantina aumentou de 12-30% no milho e de 7-15% no espinafre. Estas alterações são decorrentes da isomerização ocorrida durante o cozimento. Segundo Subagio & Morita,<sup>62</sup> a esterificação do grupamento OH da molécula da luteína com ácidos graxos aumenta a estabilidade do carotenóide frente ao calor.

## **Conclusão**

Como os seres humanos não apresentam a capacidade de sintetizar carotenóides, é necessária uma dieta balanceada com consumo de alimentos ricos nestes compostos.

Apesar das diferenças encontradas na literatura, há um consenso de que couve, rúcula, agrião, mostarda, acelga, espinafre, azedinho e brócolis são vegetais ricos em luteína e, portanto, seu consumo contribui significativamente para auxiliar na proteção do organismo contra doenças degenerativas, uma vez que a luteína é comprovadamente um potente antioxidante.

O fato do lobrobô, da serralha, do almeirão e da taioba apresentarem teores elevados de luteína merece larga divulgação, visando ampliar o consumo das referidas fontes vegetais, com vistas à manutenção da saúde.

**ABSTRACT:** This study constitutes a bibliographic review on scientific data about lutein and its effects as antioxidant compound. Lutein is a carotenoid capable of dissipating energy from free radicals and capturing the singlete oxigen. Free radicals act continuously in the organism and therefore could unchain serious celular damages such as the developing of cancer and other cronic deseases. Researches have shown that lutein protects molecules of lipidics, protein membranes, lipidic proteins of low density, proteins and DNA against the attack of radicals. Therefore, lutein plays an important role in the protection of deseases especially when it comes to reducing the risks of age-related macular degeneration (AMD). The consumption of foods rich in lutein, such as vegetables of green leaves, has been suggested since it shows preventive measurements toward the former heath problems. The lutein daily

consumed by Brazilians is an important bioactive compound that could also be used as a non-compound in foods with functional properties claim.

KEY WORDS: Antioxidant; carotenoids; lutein.

### **Referências bibliográficas**

1. ALBERG, A.J. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. **Toxicology**, v.180, p. 121-137, 2002.
2. ALEMAN, T.S. et al. Macular pigment and lutein supplementation in Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, p.1873-1881, 2001.
3. ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicol. Lett.**, v. 150, p. 57-83, 2004.
4. AMAN, R. et al. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr.**, v.1074, p. 99-105, 2005.
5. AMAR, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Microstructure transitions derived from solubilization of lutein and lutein esters in food microemulsions. **Colloids Surf. B: Biointerf.**, v. 33, p. 143-150, 2004.
6. ANTIOXIDANTES carotenóides e câncer de colon. Disponível em: <http://64.233.161.104/search?q=cache:jlPXIVRcNmIJ:www.oxiline.com.br/oxiline/ARTIGOS.doc+lute%C3%ADna+c%C3%A2ncer&hl=pt-BR&gl=br&ct=clnk&cd=14>. Acesso em: 19 maio 2006.

7. AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Comp. Anal.**, v. 17, p. 385-396, 2004.
8. BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of calendula products. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 53, p. 242-250, 2002.
9. BEATTY, S. et al. Macular pigment and age related macular degeneration. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 867-877, 1999.
10. BERNSTEIN, P.S. et al. Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. **Exp. Eye Res.**, v. 72, p. 215-223, 2001.
11. BERNSTEIN, P.S. et al. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in the living human eye. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 163-169, 2004.
12. BONE, R.A. et al. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. **Exp. Eye Res.**, v. 71, p. 239-245, 2000.
13. BONE, R.A. et al. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 234-240, 2001.
14. BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G.F. (Ed.) **Natural foods colorants**. New York: Blackie, 1992. p. 142-148.
15. BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 517-524, 1999.
16. CARVALHO, L.S. de. **Distribuição qualitativa e quantitativa de carotenóides e seus metabólitos em tecidos oculares**. 2000. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

17. CHASAN-TABER, L. et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 509-516, 1999.
18. CHEW, B.P.; WONG, M.W.; WONG, T.S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3689-3694, 1996.
19. CIRCULATION. **Luteína: prevenção de doenças cardíacas.** Disponível em: <http://www.emedix.com.br/not/not2001/01jun18car-aha-anv-coracao.php>. Acesso em: 03 jun. 2004.
20. DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T.M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, v. 71, p. 147-164, 2000.
21. DELI, J. et al. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 925-928, 2004.
22. DUQUE, F.L.V. **Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco.** Disponível em: <http://www.artériosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/2/Atualizacaop50.htm>. Acesso em: 20 maio 2006.
23. EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.
24. FONTANA, J.D. et al. **Carotenóides cores atraentes e ação biológica.** Disponível em: <http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>. Acesso em: 23 jun. 2004.
25. FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progr. Lipid Res.**, v. 43, p. 228-265, 2004.

26. HAMMOND, B.R.; WOOTEN, B.R.; SNODDERLY, D.M. Preservation of visual sensitivity of older subjects: association with macular pigment density. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 39, n. 2, p. 397-406, 1998.
27. KOH, H.H. et al. Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. **Exp. Eye Res.**, v. 79, p.21-27, 2004.
28. KRINSKY, N.I.; JONHSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol. Aspects Med.**, v. 26, p. 459-516, 2005.
29. KRUGER, C.L. et al. An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: case study using a crystalline lutein product. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1535-1549, 2002.
30. LAJOLO, F. **Zeaxantina e luteína reduzem riscos de degeneração macular.** Disponível em: [http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista\\_artigo.php?cod=325](http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista_artigo.php?cod=325). Acesso em: 01 jun. 2004.
31. LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, n. 1, p. 28-40, 2001.
32. LICOPENO, luteína e zeaxantina: mais do que potentes antioxidantes. **Aditivos & Ingredientes**, v. 24, p.48-61, 2003.
33. LOEFF, R. F.; et al. O perfil dos cirurgiões no Sul do Brasil. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, p. 621-625, 2003.
34. LONGNECKER, M.P. et al. Intake of carrots, spinach, and supplements containing vitamin A in relation to risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.**, v. 6, p. 887-892, 1997.

35. LUTEIN and zeaxanthin in the eye. Disponível em: [http://www.dsm.com/en\\_US/html/dnpus/di\\_lutein\\_scientific2.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dnpus/di_lutein_scientific2.htm). Acesso em: 25 set. 2006.
36. MANUAL MERCK. **Distúrbio do olho**. Disponível em: [www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec20\\_225.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec20_225.htm). Acesso em: 25 set. 2006.
37. MARES-PERLMAN, J.A. et al. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, p. 424-432, 2001.
38. MEJÍA, E.G.; LOARCA-PINA, G.; RAMOS-GÓMEZ, M. Antimutagenicity of xanthophylls in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. **Mutat. Res.**, v. 389, p. 219-226, 1997.
39. MELLO, M.C. de. **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenóides**. 2002, 113 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
40. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: \_\_\_\_\_. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Chicago: CRC Press LLC, 2002. cap. 3.
41. MIRANDA, M. et al. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. **Arch. Soc. Espan. Oftalmol.**, v.79, p. 289-294, 2004.
42. NACHTIGALL, A.M. **Luteína em vegetais verdes**. 54 f. 2006. Trabalho apresentado à disciplina TAL 700 do Programa de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

43. NAUMANN, R.B. **Doenças genéticas humanas: Retinite pigmentar.** Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/DHG/DHG018.htm>. Acesso em: 21 set. 2006.
44. OLMEDILLA, B. et al. Lutein, but not  $\alpha$ -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. **Nutrition**, v.19, p.21-24, 2003.
45. PRISFAR. **Casos de sucesso: Luteína purificada pela primeira vez nas farmácias portuguesas, pelas mãos da Prisfar.** Disponível em: <http://www.calendulafarma.com.br/luteina.htm>. Acesso em: 01 jun. 2004.
46. POLYAKOV, N.E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biol. Med.**, v. 31, n. 3, p. 398-404, 2001.
47. RICHER, S.O.D. Part 2: ARMD-pilot (case series) environmental intervention data. **J. Ame. Optom. Assoc.**, v. 70, n.1, p. 24-47, 1999.
48. RISO, P. et al. Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 14, p.150-56, 2004.
49. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods.** Washington: ILSI - International Life Sciences Institute, 2001. 64 p.
50. SÁ, M.C. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.**, v. 83, p. 595-600, 2003.
51. SANTOS, A.B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 52, n. 2, p.322-326, 2005.

52. SCHALCH, W. **A Importância dos carotenóides.** Disponível em: [http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista\\_artigo.php?cod=345](http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista_artigo.php?cod=345). Acesso em: 01 jun. 2004.
53. SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun. 2004.
54. SEDDON, J.M. et al. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 276, p. 1142-1146, 1996.
55. SHAO, A.; DEFREITAS, Z. **Lutein for healthy eyes.** Disponível em: <http://www.vitaminretailer.com/SIE/articles/Lutein.htm>. Acesso em: 01 de jun. 2004.
56. SILVA, A.G da. **Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos do tomate processado (*Lycopersicon esculentum* Mill).** 2001. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
57. SILVA, C.R.de M.; NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.14, n.2, p.135-143, 2001.
58. SILVA, P.C.F. da. **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uvas branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados.** 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
59. SOUTHON, S.; FAULKS, R. Carotenoids in food: bioavailability and functional benefits. In: \_\_\_\_\_. **Phytochemical functional foods.** Chicago: Woodhead CRC Press LLC, 2003. cap. 7.

60. SOWBHAGYA, H.B.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N. Natural colorant from marigold-chemistry and technology. **Food Rev. Int.**, v. 20, n. 1, p. 33-50, 2004.
61. STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim. Biophys.**, v.1740, p.101-107, 2005.
62. SUBAGIO, A.; MORITA, N. Prooxidant activity of lutein and its dimyristate esters in corn triacylglyceride. **Food Chem.**, v. 81, p. 97-102, 2003.
63. SUMANTRAN, V.N. et al. Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. **Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.**, v. 9, p. 257-263, 2000.
64. TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.21, n.3, p.310-313, 2001.
65. YEUM, K. et al. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherol in human lenses. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.
66. YEMELYANOV, A.Y.U.; KATZ, N.B.; BERNSTEIN, P.S. Ligand-binding characterization of xanthophyl carotenoids tp solubilized membrane protein derived from human retina. **Exp. Eye Res.**, v. 72, n. 4, p. 38-392, 2001.
67. ZHANG, S. et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 91, n. 6, p. 547-556, 1999.

# CARACTERIZAÇÃO DAS FLORES DE *Tagetes patula* L. E *Calendula officinalis* L. COMO FONTES DE LUTEÍNA

## RESUMO

O teor de luteína e a caracterização do perfil cromatográfico das flores amarelas, laranjas e marrons de *Tagetes patula* L. (tagetes), bem como das flores amarelas e laranjas de *Calendula officinalis* L. (calêndula) foram determinados por espectrofotometria no visível e comportamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As flores de *Tagetes patula* L. marrom apresentaram o maior teor de luteína (1230,6 mg.100 g<sup>-1</sup>), diferindo significativamente das demais. No entanto, a concentração de luteína nas flores de *C. officinalis* L. (29,80 mg.100 g<sup>-1</sup>) assemelhou-se a observada nas flores amarela de *T. patula* L. (59,7 mg.100 g<sup>-1</sup>). O perfil de carotenóides obtido por CLAE para as flores laranjas e marrons de *T. patula* L. foi semelhante, porém diferiu do encontrado para as flores amarelas de *T. patula* L., assim como do apresentado pelas flores amarelas e laranjas de *C. officinalis* L. Nas flores de tagetes a luteína constituiu o carotenóide majoritário, o que não foi verificado na calêndula. Fato que vem confirmar a potencialidade do emprego de *T. patula* L. como fonte de luteína.

**Palavras-chave:** Tagetes; calêndula; carotenóides; luteína; corante natural.

## SUMMARY

CHARACTERIZATION OF *Tagetes patula* L. AND *Calendula officinalis* L. FLOWERS AS SOURCES OF LUTEIN. The contents of lutein and characterization of the chromatographic performance of the yellow, orange and brown *Tagetes patula* L. (african marigold) as well as the yellow and orange *Calendula officinalis* L. (marigold) flowers were determined by UV-visible spectra and high-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The *T. patula* L. brown showed the greatest content of lutein (1230,6 mg.100g<sup>-1</sup>), which significantly differed from the others. However, the concentration of lutein in the *C. officinalis* L. (29,80 mg.100g<sup>-1</sup>) was similar to the

concentration observed in the yellow *T. patula* L. (59,7 mg.100g<sup>-1</sup>). The carotenoids profile, obtained by HPLC, from the orange *T. patula* was similar to the one acquired from the brown *T. patula* L. flowers. This profile was different from those obtained from the yellow *T. patula* L. flowers as well as the ones acquired from the yellow and orange *C. officinalis* L. Lutein constituted the vast majority of carotenoids present in the african marigold although it was not the main carotenoid observed in marigold. Fact that comes to confirm the potentiality of the job of *T. patula* L. as lutein source.

**Key words:** african marigold, marigold, carotenoids, lutein, natural colorants.

## 1 INTRODUÇÃO

A luteína, carotenóide diidroxilado pertencente a classe das xantofilas de coloração amarela, atua como antioxidante, protegendo as células dos danos oxidativos, conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas. Estudos mostram que a luteína protege moléculas de lipídios, membranas protéicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra o ataque dos radicais livres, tendo um papel essencial na proteção de doenças, notadamente na redução do risco da degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Este carotenóide macular destaca-se também pelos efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças [2, 7, 8, 13, 14, 22, 42].

Atualmente, a única flor cultivada comercialmente como fonte de luteína é a de *Tagetes erecta* L. Esta planta originária do México apresenta flores de coloração amarela a laranja amarronzada que tem sido amplamente estudadas e cujo uso está diretamente associado ao seu elevado conteúdo de luteína esterificada [16,18].

As propriedades biológicas da luteína extraída de *Tagetes erecta* L. foram constatadas em diversos estudos. Inibiu a atividade mutagênica de 1-nitropireno em *Salmonella typhimurium*, provavelmente pela formação de um complexo entre a luteína e o 1-nitropireno, o qual poderia limitar a biodisponibilidade deste último [24]. Em outro estudo, a luteína de extratos de *T. erecta* L. supriu o crescimento de tumores mamários e realçou a

proliferação de linfócitos em ratos [9, 26]. Em humanos foi demonstrado que ésteres de luteína de extratos de *T. erecta* L. são absorvidos eficientemente na corrente sanguínea [6]. Esses resultados foram reforçados por um outro experimento no qual houve um aumento nos níveis de luteína no plasma e na densidade óptica do pigmento macular após a ingestão de luteína extraída de flores de *T. erecta* L. [21]. O benefício destes efeitos foi demonstrado por estudos epidemiológicos que constataram uma relação inversa significativa entre o consumo de luteína e zeaxantina ou níveis plasmáticos destes carotenóides e o risco de degeneração macular [33]. Embora as flores de *T. erecta* L. sejam usadas na medicina mexicana tradicional, as mesmas não são empregadas freqüentemente na medicina convencional [23]. Um dos raros exemplos é o agente oftalmológico Adaptinol, extraído de pétalas desta flor e constituído principalmente de luteína dipalmitato [16].

Outra possível fonte de luteína é a *Calendula officinalis* L., planta da família das Compostas, conhecida popularmente como calêndula ou maravilha, possui flores alaranjadas das quais se extrai óleo por maceração que apresenta ação externa e interna sobre feridas traumáticas, produzindo rápida cicatrização e impedindo a supuração [5, 29, 40].

É uma planta anual cultivada no mundo todo. Suas flores são usadas tanto do ponto de vista ornamental como para fins farmacêuticos e cosmetológicos [39]. Seu poder curativo é extensamente conhecido e, portanto, tem sido largamente usada na terapia popular, uma vez que é dotada de propriedades antissépticas, antiinflamatória, antiespasmódica, colerética, sudorífica, emenagoga, hipotensora, vulnerária, antibiótica, antialérgica, tonificante, calmante, cicatrizante e na prática médica é utilizada para aliviar cólicas, dores de estômago, etc. [5, 11, 20, 29, 32, 40].

Figura entre as principais plantas medicinais no Brasil, com grande demanda pela indústria farmacêutica, sendo também utilizada como fitoterápico na rede pública de saúde de alguns municípios brasileiros [17] e reconhecida oficialmente no Brasil como medicamento fitoterápico com propriedades antiinflamatórias e antisépticas, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA [3].

A sua composição química é bastante variada, compreendendo um complexo formado por caroteno e manganês, um saponosídeo, um glicosídeo, diversos esteróides, polifenóis, alcoois triterpênicos e triterpenos pentacíclicos [29, 36].

Abou-El-Maati e Abd-Ellatif [1] analisaram os carotenóides das flores de *Calendula officinalis* L. e identificaram,  $\beta$ -caroteno, licopeno, violaxantina, anterxantino e canxantina. O  $\beta$ -caroteno foi o mais abundante, contribuindo com 22,9% do total. Neste mesmo trabalho, os pigmentos de *C. officinalis* L. foram testados para colorir bebidas e sucos. Observou-se que a acetona (95%) foi o solvente mais efetivo na extração de carotenóides, que o melhor veículo para dispersá-los foi uma solução de amido e que a retenção da cor foi melhor nos produtos mantidos sob refrigeração. El-Hashmy e colaboradores [15] já haviam isolado e purificado o  $\beta$ -caroteno de flores secas e frescas de *C. officinalis* L.

Valdés e Garcia [39] publicaram uma revisão sobre *C. officinalis* L. abordando aspectos da farmacognosia, químicos e farmacológicos. Os carotenóides incluídos na compilação foram  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentioxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epóxi-caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno, mutatoxantina e epóxido de luteína.

Deve-se lembrar que no Brasil existe uma diversidade de flores de colorações laranja e amarela que podem ser fonte de luteína e, além do mais, o país possui potencial para aumentar a produção de flores, bastando observar os microclimas privilegiados, a disponibilidade de terra, água, mão-de-obra e tecnologias agrônômicas disponíveis. Sendo assim, o presente trabalho teve como meta caracterizar e quantificar o teor de luteína em *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Flores de *Tagetes patula* cv. *French Marigold*, cultivares Yellow, Orange e Flame nas cores amarelas, alaranjadas e marrons com borda amarela, respectivamente, e flores de cores amarelas e alaranjadas de

*Calendula officinalis* L. foram cultivadas no Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As plantas foram cultivadas a pleno sol e no plantio foram fertilizadas com 50 L.m<sup>-2</sup> de matéria orgânica, 50 g.m<sup>-2</sup> de nitrogênio na forma de sulfato de amônio, 150 g.m<sup>-2</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples e 20 g.m<sup>-2</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio. Após a coleta das flores, nos meses de novembro de 2004 a fevereiro de 2005, estas foram classificadas e separadas em lotes de acordo com a coloração das pétalas (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos lotes de flores avaliados

Flores	Nº de Lotes	Nº de flores por lote
Tagetes amarelo	6	52
Tagetes laranja	7	638
Tagetes marrom	7	1526
Calêndula amarela	6	84
Calêndula laranja	6	184

As flores centrais e periféricas foram destacadas e secas em secador de circulação de ar, marca Paralex, modelo Excalibur Food Dehydration, à temperatura de 60 °C por 3h. As flores secas, com umidade final de 10%, foram homogeneizadas dentro dos lotes em triturador de alimentos e armazenadas em freezer doméstico (-15 ± 2 °C). O peso das amostras submetidas a análise variou em torno de 1g para cada lote.

## 2.2 Extração e saponificação

Os pigmentos das amostras foram extraídos exaustivamente com tetraidrofurano. A saponificação foi realizada com uma solução etanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. A extração e a saponificação ocorreram na ausência de luz e em temperatura ambiente por 24h, sendo realizadas simultaneamente. A seguir o extrato foi separado por filtração e transferido para éter de petróleo. A retirada completa do álcali e do solvente foi realizada por meio de sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados foram concentrados a vácuo em

evaporador rotatório à temperatura máxima de 35° C e secos em corrente suave de nitrogênio.

### **2.3 Confirmação da Identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína**

A identificação do carotenóide majoritário nas amostras foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por Nunes & Mercadante [25], empregando o cromatógrafo líquido Shimadzu CLASS-VP.

A confirmação da presença da luteína baseou-se na avaliação conjunta do comportamento em CLAE, baseado no tempo de retenção e co-cromatografia com padrão autêntico de luteína, e espectro de absorção no visível obtido em espectrofotômetro UV/VIS digital, marca HITACHI, modelo U-2001.

Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm), utilizando metanol (0,1% de trietilamina)/metil-tert-butil éter 95:5 como fase móvel, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em modo isocrático, injeção de 30 µL, sendo os cromatogramas obtidos a 450 nm.

Os solventes utilizados foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm, apropriada para solvente orgânico e, a seguir, degaseificados em ultra-som. As amostras foram ressuspensas em 2 mL de metil-tert-butil éter e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 µm de poro.

Os espectros de absorção no visível foram obtidos em espectrofotômetro, seguindo metodologia descrita por Cisneros [10]. Os extratos foram ressuspensos em etanol absoluto e a leitura foi realizada a 445 nm.

A quantificação do teor de luteína nas amostras foi efetuada por padronização externa. A curva de calibração foi construída com seis pontos e a faixa de concentração utilizada foi de 0,002 a 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados estatisticamente fazendo uso da Análise de Variância e Teste de Duncan para diferenças entre médias ao nível de 95% de confiabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico dos extratos saponificados das flores amarelas, laranjas e marrons de *T. patula* L., bem como das flores amarelas e laranjas de *C. officinalis* L.

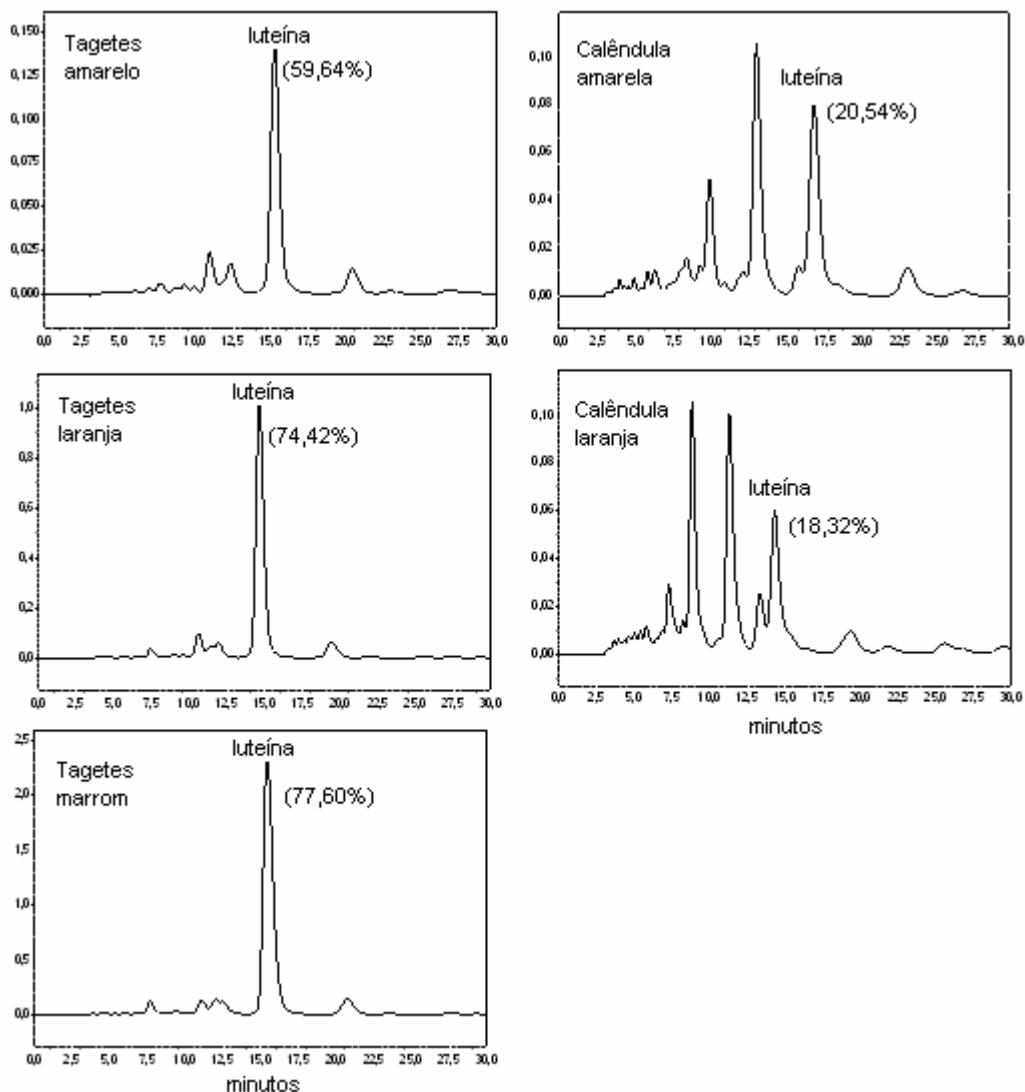


Figura 1 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de tagetes e calêndula. Coluna polimérica C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm; Fase móvel: metanol (0,1% TEA)/metil-tert-butil éter em modo isocrático e fluxo de 1 L.min<sup>-1</sup>.

Nas amostras de *T. patula* L. a luteína figurou como o carotenóide majoritário (59,64% na amarela; 74,42% na laranja e 77,60% na marrom) apresentando traços de outros carotenóides não identificados. Os dados estão de acordo com trabalho desenvolvido por Philip e Berry [28], que

afirmaram que a luteína é o pigmento majoritário que contribui para a coloração das flores de *T. erecta* L., responsável por 60% do total de carotenóides presentes. Concordando ainda, com a revisão realizada por Peña et al. [27], em que os pesquisadores constataram que em extratos de *T. erecta* L., após a saponificação com NaOH a 90 °C, 80-90% dos carotenóides eram luteína, 5% zeaxantina e 5 a 15% outros carotenóides, como violaxantina e criptoxantina.

Segundo Showbhagia et al. [34], não menos que 17 componentes foram identificados em *T. erecta* L. No entanto, a contribuição dos outros pigmentos que não são luteína (72,3%), zeaxantina (16,4%), fitoeno (2,4%) e fitoflueno (2,6%) é insignificante. Nos estudos de Hadden et al. [19] e Rivas [31] e os ésteres de luteína representaram 88,0 e 95,5% do total de carotenóides presentes nas flores de *T. erecta* L., respectivamente.

Quackenbush e Miller [30] ao analisarem 17 extratos de tagetes, constataram que 88 a 92% das xantofilas eram luteína e zeaxantina, sendo que luteína predominava. Vasudevan et al. [41] encontraram em extratos de *T. erecta* L. 86,1% de xantofilas.

Atualmente, tanto a luteína como a zeaxantina podem ser facilmente isoladas ao empregar uma coluna polimérica C<sub>30</sub>, o que pode ser visualizado pela boa resolução dos cromatogramas da Figura 1. Porém, a mesma eficiência não foi verificada na separação dos carotenóides presentes nas flores de calêndula, o que pode ser alvo de trabalhos posteriores.

Nas amostras de *C. officinalis* L., a luteína foi responsável por somente 19,43% dos carotenóides totais, porém superior aos teores de 4,6 e 5,7% encontrados por Tóth e Szabolc [37] e Bakó, Deli e Tóth [4], respectivamente ao empregarem coluna C18 e trabalhar com pétalas frescas. Já em chá de calêndula (pétalas secas) Bakó, Deli e Tóth [4] constataram um teor de luteína variando entre 15 e 25%, concordando com a proporção encontrada no presente trabalho que empregou flores desidratadas de calêndula.

As distintas tonalidades apresentadas pelas flores avaliadas é consequência de diferenças qualitativas e quantitativa em relação a presença de carotenóides e demais compostos. O que pode ser confirmado

ao avaliar os perfis cromatográficos das respectivas flores (Figura 1), bem como as diferenças nos teores de luteína das memas (Tabela 1).

As flores laranja e marrom de *T. patula* L. apresentaram semelhante proporção e perfil cromatográfico, os quais diferiram um pouco do *T. patula* L. amarelo e totalmente do comportamento apresentado pelas flores de *C. officinalis* L. (Figura 1). Estes resultados indicam que os tagetes laranja e marrom diferem na presença e ou concentração de pigmentos que não sejam carotenóides, uma vez que a coloração das flores é determinada pela soma da absorção da luz de todos os pigmentos presentes, esses dados contrariam a afirmação de Valadon e Mummery [38] que, ao investigarem onze diferentes espécies de flores, verificaram que as diferenças de tonalidade percebidas nas flores de tagetes, as quais variavam de amarelo a laranja, eram devido a diferença nos carotenóides totais, já nas outras espécies analisadas as flores amarelas estavam associadas a presença de xantofila e as laranjas a presença de carotenos.

Foi encontrado um teor médio de 1230,2 mg.100 g<sup>-1</sup> de luteína nas flores marrom de *T. patula* L. (Tabela 2). Esta concentração está em níveis superiores aos encontrados por Gregory et al. [18] que avaliaram o teor de luteína em flores frescas *T. erecta* L. de coloração laranja marrom (80 mg.100 g<sup>-1</sup>). Nas flores exploradas comercialmente, laranjas e laranjas escuras, os autores supracitados encontraram um teor variando de 40 a 67 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 2 – Teores de luteína nas flores de tagetes e calêndula (mg.100 g peso seco<sup>-1</sup>)

Flores	Luteína
Tagetes amarelo	59,7 c
Tagetes laranja	407,6 b
Tagetes marrom	1230,2 a
Calêndula amarela	29,5 c
Calêndula laranja	30,1 c

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Duncan (p≤0,05).

De acordo com Tsao et al. [35], em flores de *T. erecta* L. encontra-se 0,6 a 2,5% de xantofilas em base seca, considerando um teor de luteína de 90% do teor de carotenóides teria-se uma variação no teor de luteína entre 540-2250 mg.100 g<sup>-1</sup>, o que concorda com os valores encontrados para os *T. patula* L. laranja e marrom.

Se levarmos em consideração a contribuição da luteína no total de carotenóides nas flores de *T. patula* L. marrom (77,6%), os dados do presente trabalho concordam com os de Delgado-Vázquez e Paredes-López [12] que reportaram um total de carotenóides de 1140 a 1740 mg.100 g<sup>-1</sup> em *T. erecta* L. desidratados.

A concentração de luteína na calêndula foi similar (29,5 mg.100g<sup>-1</sup> na amarela e 30,1 mg.100g<sup>-1</sup> na laranja), porém inferior, à do *T. patula* L. de menor concentração (59,7 mg.100g<sup>-1</sup>), o que apesar da oferta durante todo ano e da boa produção apresentada pela calêndula, pode vir a impossibilitar o seu emprego como fonte de luteína, ainda mais se levarmos em consideração que o rendimento em pétalas secas do tagetes é superior ao apresentado pela calêndula. No entanto, os baixos teores apresentados pela calêndula podem ser consequência da estação em que as mesmas foram produzidas e coletadas. Não obstante, o teor de luteína na calêndula foi superior a 14,04 mg.100g<sup>-1</sup> conforme revisão de Valdés e García [39] ao considerarem que na calêndula o teor de carotenóides é de 0,078 %.

Estes são dados importantes para a floricultura brasileira. Embora seja difícil precisar os números da produção de flores e plantas ornamentais no Brasil, em virtude da inconsistência das informações disponíveis, sabe-se que apesar de sua enorme dimensão territorial e biodiversidade, o país não figura entre os grandes produtores de plantas ornamentais e de flores no mercado mundial. Entretanto os resultados encontrados para *T. patula* L. laranja e marrom abrem para o setor de floricultura a perspectiva de comercialização não apenas de mudas e sementes da planta com fins ornamentais, mas também farmacêuticos e cosmetológicos, podendo fomentar programas de estímulo à agricultura familiar, uma vez que poderão ser utilizadas propriedades de grande à pequeno porte.

#### 4 CONCLUSÃO

O *T. patula* L., pode ser considerado uma fonte competitiva e promissora de luteína se comparado ao *T. erecta* L.

Embora os *T. patula* L. laranja e marrom apresentem perfis cromatográficos semelhantes, deve-se dar prioridade ao emprego do marrom, uma vez que esse apresenta teores de luteína significativamente superiores ao laranja.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-EL-MAATI, S.M.; ABD-ELLATIF, E. Studies on carotenoid pigments isolated from petals of *Calendula officinalis* as food colouring agents. IN: Food Science Symposium, University of Alexandria, Egypt, p. 140-149, 1992.
2. ALEMAN, T. S. et al. Macular pigment and lutein supplementation in Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, p.1873-1881, 2001.
3. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação e resoluções**. Disponível em <<http://www.anvs.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2003.
4. BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. **J. Biochem. Biophys. Methods**. n. 53, p. 241–250, 2002.
5. BISSO, F. P. **Composição química e microbiológica de biofertilizantes líquidos e aplicação foliar em calêndula**. Porto Alegre, RS. UFRGS, 2003. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
6. BOWEN, P. E. et al. Evaluation of bioavailability of lutein diesters in humans. **FASEB J.**, v. 11, p.2587, 1997.
7. BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 517-524, 1999.
8. CHASAN-TABER, L. et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 509-516, 1999.

9. CHEW, B. P.; WONG, M. W.; WONG, T. S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3689-3694, 1996.
10. CISNEROS, M. et al. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoide*. **J. Chromatogr. B**, s. n., s. p., 2004.
11. CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CHAFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.
12. DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Effect of enzymatic treatments of marigold flowers (*Tagetes erecta*). **Food Chem.**, v. 58, p. 255-258, 1997.
13. DELI, J. et al. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 925-928, 2004.
14. DUQUE, F.L.V. **Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco**. Disponível em: <http://www.arteriosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/2/Atualizacaop50.htm>. Acesso em: 20 maio 2006.
15. EL-HASHMY, F.S.A.; BADIE, A.Z.M.; MEGAHED, M.Y. Isolation and purification of  $\beta$ -carotene from fresh and dried calendula flowers. **Minia J. Agric. Res. Dev.** v. 8, p. 225-240, 1986.
16. GAU, W.; PLOSCHKE, H.J.; WÜNSCHE, C. Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid ester from marigold (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and craig counter-counter distribution. **J. Chromatogr.**, v. 262, p. 277-284, 1983.
17. GRAÇA, C. Ver Saúde – Curitiba. In: JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS, 3., 2001, Lages. **Anais...** Lages: CAV-UDESC; Tubarão: ACPM, 2001. p.31-35.
18. GREGORY, G. K.; CHEN, T. S.; PHILIP, T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. **J. Food Sci.**, v. 51, p. 1093-1094, 1986.
19. HADDEN, W. L. et al. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4189-4194, 1999.

20. ISAAC, O. **Die Ringelblume:** botanik, chemie, pharmakologie, toxicologie, pharmazie und therapeutische verwendung. Stuttgart: WV-G, 1992. 120p.
21. LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, n. 1, p. 28-40, 2001.
22. LANDRUM, J.T., et al. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. **Exp. Eyes Res.**, v. 65, p. 57-62, 1997.
23. MEDIANTA, R.M.; DEL-AMOS, S.R. Plantas medicinalis del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, CECSA, Yucatán, México, p 330, 1981.
24. MEJÍA, E.G.; LOARCA-PINA, G.; RAMOS-GÓMEZ, M. Antimutagenicity of xanthophylls in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. **Mutation Res.**, v. 389, p. 219-226, 1997.
25. NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z: utilização de colunas de fase reversa C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> para separação de carotenóides por CLAE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD-Rom.
26. PARK, J.S.; CHEW, B. P.; WONG, T. S. Effect of dietary lutein on growth of mammary tumor in BALB/c mice. **FASEB J.**, v. 11, p. 2586-2594, 1997.
27. PEÑA, M.M.; CUEVAS, A.C.; GONZÁLEZ, E.A. Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel em pollos de engorda. **Téc. Pecu. Méx.**, v 42, n. 1, p. 105-111, 2004.
28. PHILIP, T.; BERRY, J.W. Nature of lutein acylation in marigoldi (*Tagetes erecta*) flowers. **J. Food. Sci.**, v. 40, p. 1089-1090, 1975.
29. POZETTI, G.L. **Medicamentos homeopáticos:** algumas monografias. Ribeirão Preto : Inst. François Lamasson, 1988. 100 p.
30. QUACKENBUSH, F.W.; MILLER, S.L. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 55, p. 617, 1972.
31. RIVAS, J.D.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein acid esters from marigold flower petal powder. **J. Cromatogr.**, v. 464, p.442-447, 1989.

32. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. rev. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p. 607-632.
33. SEDDON, J.M. et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 272, p. 1413-1420, 1994.
34. SHOWBHAGIA, H.B.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N. Natural colorant from marigold-chemistry and technology. **Food Rev. Int.**, v. 20, n. 1, p. 33-50, 2004.
35. TSAO, R. et al. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1045, p. 65–70, 2004.
36. THOMSON, W.A.R. **Guia practica ilustrada de las plantas medicinales**. Barcelona : Blume, 1981. 103 p.
37. TÓTH, G.; SZABOLC, J. Occurrence of some mono-cis-isomers of asymmetric C<sub>40</sub>-carotenoids. **Phytochem.**, v. 20, n. 10, p. 2411-2415, 1981.
38. VALADON, L.R.G.; MUMMERY, R.S. Carotenoids of certain compositae flowers. **Phytochem.**, v. 6, n. 7, p. 983-988. 1967.
39. VALDÈS, H.L.; GARCÌA, R.P. *Calendula officinalis*. **Rev Cubana Farm.** n.33, p. 188-194. 1999.
40. VANNIER, L.; POIRIER, J. **Tratado de matéria homeopática**. 9 ed. s.l.: Organização Andrei, 1987. 89 p.
41. VASUDEVAN, P.; KASHYAP, S.; SHARMA, S. Tagetes: a multipurpose plant. **Biors. Tech.**, v. 62, p. 29-35, 1997.
42. YEUM, K. et al. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherol in human lenses. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.

# EFEITO DA SAPONIFICAÇÃO SOB O TEOR DE LUTEÍNA EM FLORES DE *Tagetes patula* L. E *Calendula officinalis* L.

## RESUMO

A necessidade da saponificação e a possível redução no tempo de extração de luteína foram avaliadas em flores marrons de *Tagetes patula* L. (tagetes). Realizaram-se três tratamentos empregando acetona como solvente: extração por 24 h sem saponificação, extração e saponificação com KOH etanólico 10% por 24 h e, extração por 24 h seguida de saponificação *overnight* com KOH etanólico 10%. A saponificação conjunta a extração possibilitou reduzir em ao menos 12 h o tempo de obtenção das oleoresinas. Partiu-se para um segundo experimento envolvendo as flores: marrons de *Tagetes patula* L. e laranjas de *Calendula officinalis* L. (calêndula), e os solventes: etanol, tetraidrofurano e hexano. As extrações foram realizadas por 24 h com saponificação simultânea a esta e sem saponificação. O teor de luteína e a caracterização do perfil cromatográfico das flores foram determinados por espectrofotometria no visível e CLAE. Os extratos saponificados de tagetes apresentaram em média maior concentração de luteína comparados aos não saponificados, sendo  $685,5 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e  $18,2 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Nos extratos de calêndula a saponificação não contribuiu significativamente para o aumento do teor médio de luteína, apresentando uma concentração de  $11,2 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  nos extratos sem saponificação e  $18,9 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  nos saponificados. O perfil cromatográfico dos extratos de tagetes demonstrou um nítido aumento na proporção de luteína e redução nos demais carotenóides. Nos extratos de calêndula percebeu-se o aumento de outros pigmentos. Com isso, confirma-se a necessidade da saponificação do tagetes, ao passo que, para calêndula esta não se faz necessária.

**Palavras-chave:** tagetes; calêndula; luteína; saponificação.

## SUMMARY

EFFECTS OF SAPONIFICATION OVER THE CONTENTS OF LUTEIN IN *Tagetes patula* L. AND *Calendula officinalis* L. FLOWERS. The necessity of saponification processes and the possibility of reducing the time of the extraction of lutein were analyzed by using brown *Tagetes patula* L. (african marigold) flowers. They took place three treatments using acetone as solvent: extraction for 24 hours without saponification, extraction and saponification using a solution of 10% KOH in ethanol for 24 hours, and extraction for 24 hours, followed by an overnight saponification using a solution of 10% KOH in ethanol. The saponification conducted simultaneously to the extraction, actually reduced the time of obtaining oilresins in at least 12 hours. A second experiment was begun involving the brown *T. patula* L. and orange *Calendula officinalis* L. (marigold) flowers as well as the solvents ethanol, tetrahydrofuran and hexane. The extractions were conducted with a simultaneous saponification, for 24 hours, and without saponification. The contents of lutein and characterization of the flowers were determined by UV-visible spectra and HPLC. The saponified african marigold extracts showed, on average, greater lutein concentration when compared to the extracts which were not submitted to saponification, being 685.5 e 18.2 mg.100g<sup>-1</sup>, respectively. In the marigold extracts, the saponification process did not contribute significantly to increase the average content of lutein, showing 11.2 mg. 100g<sup>-1</sup> without saponification and 18.9 mg. 100g<sup>-1</sup> with saponification. A clear increase in the lutein content as well as a decrease in other present saponified carotenoids was verified when analyzing the chromatographic profiles of african marigold extracts. In the marigold extracts, there was an increase in the content of other pigments. Thus, it can clearly be noticed the necessity of saponification processes of the african marigold, whereas it is not necessary when dealing with marigold.

**Key words:** african marigold; marigold; lutein; saponification.

## 1 INTRODUÇÃO

A luteína, carotenóide diidroxilado pertencente a classe das xantofilas [18], é um potente antioxidante que previne os danos causados por radicais livres nos tecidos [3, 28, 29]. Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da degeneração macular relacionada a idade (DMRI), destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças [3, 6, 7, 11, 12, 17, 31].

Os ésteres de luteína de extratos de *Tagetes erecta* L. são eficientemente absorvidos no plasma humano [5]. A luteína extraída desta fonte vegetal suprime o crescimento de tumor mamário e aumenta a proliferação de linfócitos [24]. Apresenta propriedades anti-apoptose *in vitro*, que auxiliam na prevenção de câncer de fígado, cólon entre outros [9]. Protege as células contra danos no DNA e estimula a comunicação das junções gap [9, 19, 31].

Vários tipos de carotenóides já foram identificados em diferentes flores, sendo muito comum à presença de xantofilas esterificadas. Até o momento, apenas as flores de *Tagetes erecta* L. são empregadas como fonte comercial de luteína. Entretanto, existem muitas flores ainda não investigadas que podem ter um potencial comercial para a produção de luteína.

Com o amadurecimento das flores, as clorofilas vão desaparecendo enquanto a concentração de carotenóides aumenta. Durante este processo os cloroplastos são substituídos por cromoplastos, que possuem estruturas especializadas compostas de carotenóides, lipídios e proteínas, cuja função é acumular grandes quantidades de carotenóides. Os carotenóides nos cromoplastos das pétalas são os responsáveis pelas intensas cores amarelas, laranjas e vermelhas. Geralmente as flores maduras acumulam xantofilas aciladas como carotenóides secundários, pois parece que esta forma facilita o acúmulo e a preservação dos carotenóides [4] por ser mais lipossolúvel e estável. Esta facilita, provavelmente, a incorporação destes pigmentos pela membrana [22].

Segundo Mínguez-Mosquera, Hornero-Méndez e Pérez-Gálvez [21], a saponificação é um procedimento rotineiro na análise de carotenóides, visando eliminar materiais lipídicos e clorofilas, que interferem nos ensaios espectrofotométricos, ou ainda, na hidrólise de ésteres de xantofilas. É considerada o melhor meio para a remoção de clorofilas e produtos de degradação.

Embora esta etapa possa ser efetuada diretamente na matriz homogeneizada, freqüentemente é executada após a extração orgânica. Normalmente é realizada com solução metanólica ou etanólica de hidróxido de sódio ou potássio (5-30%) que é somada ao extrato de pigmentos. Uma diminuição no conteúdo de carotenóides é observada durante a saponificação que pode variar de alguns por cento até 100%, o que vai depender da concentração e da estrutura do carotenóide, bem como, dos procedimentos durante a saponificação [13].

Dependendo das condições empregadas (tempo, temperatura, concentração, solução de hidróxido, número e volume para partição e lavagem) os carotenóides podem produzir artefatos, sofrer isomerização, degradação, bem como, ocorrer perdas em consequência de uma recuperação incompleta durante a partição [16, 26]. Além disso, a saponificação é uma etapa demorada que envolve o uso de volumes consideráveis de solventes na partição, o que pode prolongar substancialmente o tempo e custos da análise [13].

Segundo Seo [28], a saponificação fornece excelentes resultados quando o teor de carotenóides é expresso em termos de carotenóides totais. No entanto, ao analisar os carotenóides individuais sua eficiência deixa um pouco a desejar, uma vez que o processo de saponificação propicia a ocorrência de isomerização e degradação [15].

Sá e Rodriguez-Amaya [26], encontraram uma alternativa para reduzir as perdas de xantofilas, especialmente luteína, violaxantina e neoxantina, durante a saponificação, removendo, inicialmente, a maioria das gorduras por meio de solidificação a baixas temperaturas.

Pelas considerações acima, o presente trabalho teve por objetivo verificar a possibilidade de reduzir o tempo gasto na etapa de saponificação,

bem como, avaliar a real necessidade desta etapa na extração de luteína em flores de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foram utilizadas flores marrons com bordas amarelas de *Tagetes patula* cv. *French Marigold* cultivar Flame e laranjas de *Calendula officinalis* L., cultivadas no Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, MG. As plantas foram cultivadas a pleno sol e no plantio foram fertilizadas com 50 L.m<sup>-2</sup> de matéria orgânica, 50 g.m<sup>-2</sup> de nitrogênio na forma de sulfato de amônio, 150 g.m<sup>-2</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples e 20 g.m<sup>-2</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio. Após a coleta das flores, nos meses de novembro de 2004 a fevereiro de 2005, estas foram classificadas e separadas em lotes de acordo com a espécie. Suas flores centrais e periféricas foram destacadas e homogeneizadas. As flores foram secas em secador de circulação de ar, marca Paralex, modelo Excalibur Food Dehydration, à temperatura de 60 °C por 3h. As flores secas, com umidade final de 10%, foram trituradas em triturador de alimentos e armazenadas em freezer doméstico (-18 ± 2 °C). O peso das amostras submetidas à análise variou em torno de 1g para cada lote.

### 2.2 Padronização do método de saponificação

Realizaram-se testes preliminares visando verificar a real necessidade da etapa de saponificação e a possibilidade de redução do tempo do processo extrativo de carotenóides. Estes testes consistiram em três tratamentos: extração sem saponificação (T1), extração com saponificação simultânea (T2) e saponificação após a etapa de extração (T3). As flores secas de tagetes foram submetidas a extração com acetona durante 24 h, sendo a saponificação realizada com KOH etanólico 10% (T2 - durante as 24 h de extração; T3 - "over night"). Em seguida, os extratos foram transferidos em pequenas porções para éter de petróleo em funil de separação, visando

a retirada do solvente e do álcali, as quais foram efetuadas com sucessivas lavagens com água destilada. O extrato de carotenóides foi concentrado a vácuo em evaporador rotatório a uma temperatura  $\leq 35^{\circ}\text{C}$ , finalizando a evaporação com fluxo de  $\text{N}_2$ . Todos os procedimentos foram realizados em ambiente escuro.

A quantificação do teor de carotenóides totais nas diferentes amostras foi efetuada por medidas espectrofotométricas, utilizando o coeficiente de extinção  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$  em etanol com leitura em  $\lambda_{\text{máx}} = 445 \text{ nm}$ . As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS digital, marca HITACHI, modelo U-2001, seguindo metodologia descrita por CISNEROS [8].

## **2.3 Influência da saponificação sobre o teor de luteína**

### **2.3.1 Extração do pigmento**

Após os testes preliminares de saponificação (2.2) realizou-se a extração da luteína sem saponificação e com saponificação simultânea. Os solventes empregados na extração a frio foram etanol, hexano e tetraidrofurano, sendo o hexano utilizado, também, para a extração a quente.

Na extração a frio os pigmentos das amostras foram extraídos exaustivamente com 50 mL dos solventes citados acima (24 h). A seguir o extrato foi separado por filtração e transferido para éter de petróleo, com auxílio de água destilada. A extração da luteína com saponificação foi efetuada com uma solução etanólica de KOH 10% (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. A retirada completa do álcali foi realizada por meio de sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados e não saponificados foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de  $35^{\circ}\text{C}$  e secos em corrente suave de nitrogênio.

As extrações a quente foram executadas em aparelho do tipo Soxhlet com cerca de 200 mL de hexano. Nos tratamentos com saponificação simultânea acrescentou-se diretamente ao balão de extração 50 mL de solução etanólica de KOH 10%. Procedeu-se a extração dinâmica por setes horas, seguida de extração estática “over night” (solvente em contato com a amostra), finalizando a extração com mais 1h em etapa dinâmica. A seguir os extratos foram separados por filtração e transferidos para éter de

petróleo, com auxílio de água destilada. A retirada completa do álcali e do solvente foi realizada por sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados e não saponificados foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de 35 °C e secos em corrente suave de nitrogênio. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente escuro.

### **2.3.2 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína**

A identificação do carotenóide majoritário nas amostras foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por Nunes & Mercadante [23], empregando-se o cromatógrafo líquido Shimadzu CLASS-VP.

A confirmação da presença da luteína baseou-se na avaliação conjunta do perfil em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio do tempo de retenção e co-cromatografia com padrão autêntico de luteína, e espectro de absorção no visível obtido em espectrofotômetro HITACHI U-2001.

Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm), utilizando metanol (0,1% de trietilamina)/metil-tert-butil éter 95:5 como fase móvel, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em modo isocrático, injeção de 30 µL, sendo os cromatogramas obtidos a 450 nm.

Os solventes utilizados foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm, apropriada para solvente orgânico e, a seguir, degaseificados em ultra-som. As amostras foram ressuspensas em 2 mL de metil-tert-butil éter e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 µm de poro.

Os espectros de absorção no visível foram obtidos seguindo metodologia descrita por CISNEROS [8]. Os extratos foram ressuspensos em etanol absoluto e a leitura foi realizada a 445 nm.

A quantificação do teor de luteína nas amostras foi efetuada por padronização externa. A curva de calibração foi construída com seis pontos e a faixa de concentração utilizada foi de 0,002 a 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

## 2.4 Delineamento experimental

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, sendo realizado em cascata. Inicialmente, efetuaram-se testes preliminares, visando definir se a etapa de saponificação seria realizada simultânea ao processo de extração ou separada. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

O segundo experimento constou de um total de 16 tratamentos, provenientes de um fatorial (4x2x2) de 4 métodos de extração (a frio com etanol, hexano e tetraidrofurano e a quente com hexano), dois métodos de saponificação (ausente ou simultânea) e duas variedades de flores (tagetes e calêndula), com três repetições cada.

Os dados foram analisados estatisticamente fazendo uso de Análise de Variância e Teste de Tukey para diferença entre médias ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do Software SAEG.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Padronização do método de saponificação

Ao observar os dados do primeiro experimento (Tabela 1), nota-se que o extrato de luteína obtido com saponificação simultânea a extração apresentou o maior teor de carotenóides totais em luteína, seguido pelo extrato obtido mediante saponificação após a extração. A amostra não saponificada foi a que apresentou o menor teor de carotenóides totais em luteína.

Tabela 1 - Teor de carotenóides totais, expresso em mg de luteína.100 g pétalas secas<sup>-1</sup>, nos diferentes extratos cetônicos de tagetes

Tratamento	Carotenóides totais (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Sem saponificação	105,2 C
Saponificação simultânea	561,9 A
Saponificação separada	412,1 B

\*Letras distintas evidenciam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).

Verificou-se a necessidade da etapa de saponificação quando se emprega *Tagetes patula* L. como fonte vegetal de carotenóides, principalmente de luteína, uma vez que nesta fonte os ésteres de luteína são reconvertidos à forma de luteína livre pelo processo de saponificação.

A extração e a saponificação realizadas simultaneamente possibilitam reduzir em pelo menos 12 h o tempo do processo extrativo, além de diminuir a degradação dos pigmentos por danos oxidativos.

### **3.2 Influência da saponificação sobre o teor de luteína**

A partir dos dados do item 3.1 deu-se prosseguimento ao segundo experimento. Nesse, as flores marrons de tagetes e laranjas de calêndula, foram submetidas à extração a frio com os solventes etanol, hexano e tetraidrofurano e a extração a quente com hexano. As modificações foram efetuadas na etapa de saponificação, sendo que a metade dos extratos foram submetidos a saponificação realizada simultânea a extração e a outra metade não foi saponificada, a fim de se comparar o efeito da saponificação.

Ao considerar apenas o processo de saponificação, independente do solvente e da espécie, observou-se que os tratamentos com saponificação obtiveram um teor superior de luteína ( $358,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) comparados aos tratamentos sem saponificação ( $14,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Resultados estes que vem confirmar a necessidade desta etapa na extração de carotenóides, ao eliminar impurezas e transformar os ésteres em suas respectivas formas livres.

Nas Tabela 2 e 3 pode-se visualizar as médias do teor de luteína nos extratos não saponificados e saponificados das flores de *T. patula* L. e *C. officinalis* L., em função dos diferentes solventes empregados.

Pela Tabela 2 percebe-se que os extratos saponificados de *T. patula* L. apresentaram maior concentração de luteína comparados aos extratos não saponificados. Os solventes tiveram capacidade extratora diferenciada quando da realização da saponificação, sendo que o tetraidrofurano a frio, apresentou a maior capacidade extratora.

Tabela 2 – Teor médio de luteína (mg.100 g de pétalas secas<sup>-1</sup>) em amostras saponificadas e não saponificadas de tagetes

Solvente	Sem saponificação (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Com saponificação (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Etanol a frio	28,4 Ab	266,5 Ca
Tetraidrofurano a frio	22,2 Ab	1220,0 Aa
Hexano a frio	15,2 Ab	893,9 Ba
Hexano a quente	6,9 Ab	415, 5 Ca

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).

O teor de luteína em flores de *T. patula* L. extraídas com tetraidrofurano (Tabela 2) está de acordo com o valor encontrado por Delgado-Vargas e Paredes-Lopez [10] em *T. erecta* L. extraídos sem o uso de enzimas com atividade de glicosidase, celulase, hemicelulase e pectinase. Os autores, ao avaliarem o efeito das enzimas citadas acima na extração de luteína de *T. erecta* L., reportaram um total de carotenóides de 1.140 a 1.740 mg.100 g<sup>-1</sup> em tagetes desidratados sem tratamento com enzimas e 1800 a 2470 mg.100 g<sup>-1</sup> em tagetes desidratados tratados com enzimas.

Tabela 3 – Teor médio de luteína (mg.100 g de pétala secas<sup>-1</sup>) em amostras saponificadas e não saponificadas de calêndula

Solvente	Sem saponificação (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Com saponificação (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Etanol a frio	11,2 Aa	4,2 Aa
Tetraidrofurano a frio	13,5 Aa	30,1 Aa
Hexano a frio	7,1 Aa	31,2 Aa
Hexano a quente	13,0 Aa	10,3 Aa

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).

Nos extratos de calêndula a saponificação não contribuiu significativamente para o aumento do teor de luteína e os solventes apresentaram capacidade extratora semelhante (Tabela 3). O fato pode ser justificado pelo reduzido teor de ésteres de luteína em calêndula e possíveis perdas de luteína na água de lavagem empregada na eliminação do álcali.

Váldez e Garcia [30] publicaram uma revisão sobre *C. officinalis* abordando aspectos de farmacognosia, químicos e farmacológicos. Os carotenóides incluídos na compilação foram  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentioxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epóxi-caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno, mutatoxantina e epóxido de luteína.

No entanto, Abou-EI-Maati e Abd-Elatif [1] não citaram a presença de luteína em flores de calêndula. Após analisarem os carotenóides presentes nas mesmas os autores supracitados identificaram  $\beta$ -caroteno, licopeno, violaxantina, anterxantino e canxantina, sendo  $\beta$ -caroteno o mais abundante (22,9%). Os dados expressos na Tabela 3 e na Figura 2 confirmam a presença de luteína nos extratos de calêndula.

O comportamento dos extratos de *T. patula* L. e *C. officinalis* L. frente à saponificação e aos solventes empregados na extração é confirmado pelos seus respectivos perfis cromatográficos (Figuras 1 e 2).

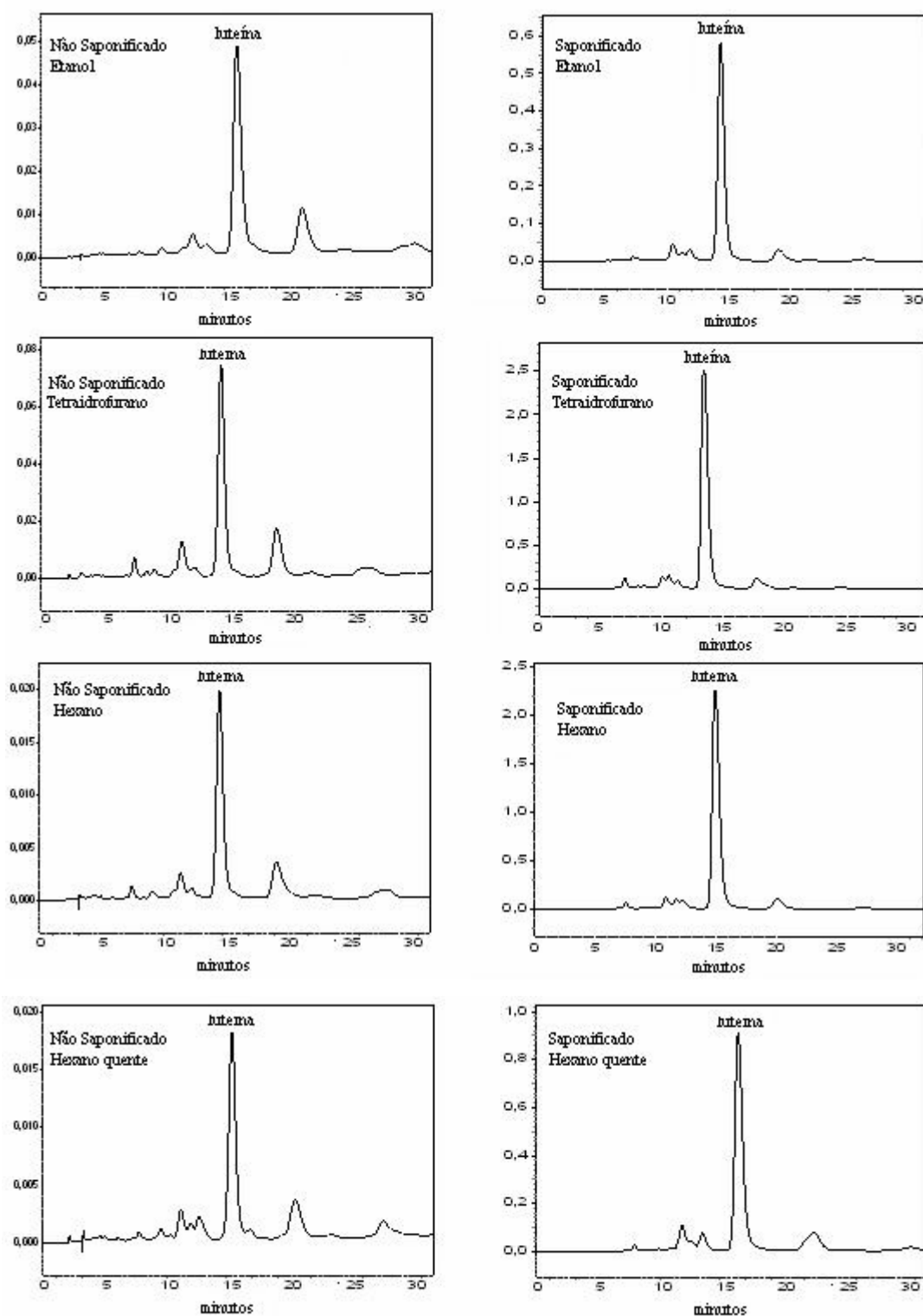


Figura 1 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificados e saponificados de flores de tagetes. Coluna polimérica C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm; Fase móvel: metanol (0,1% TEA) / metil-tert-butil éter em modo isocrático e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

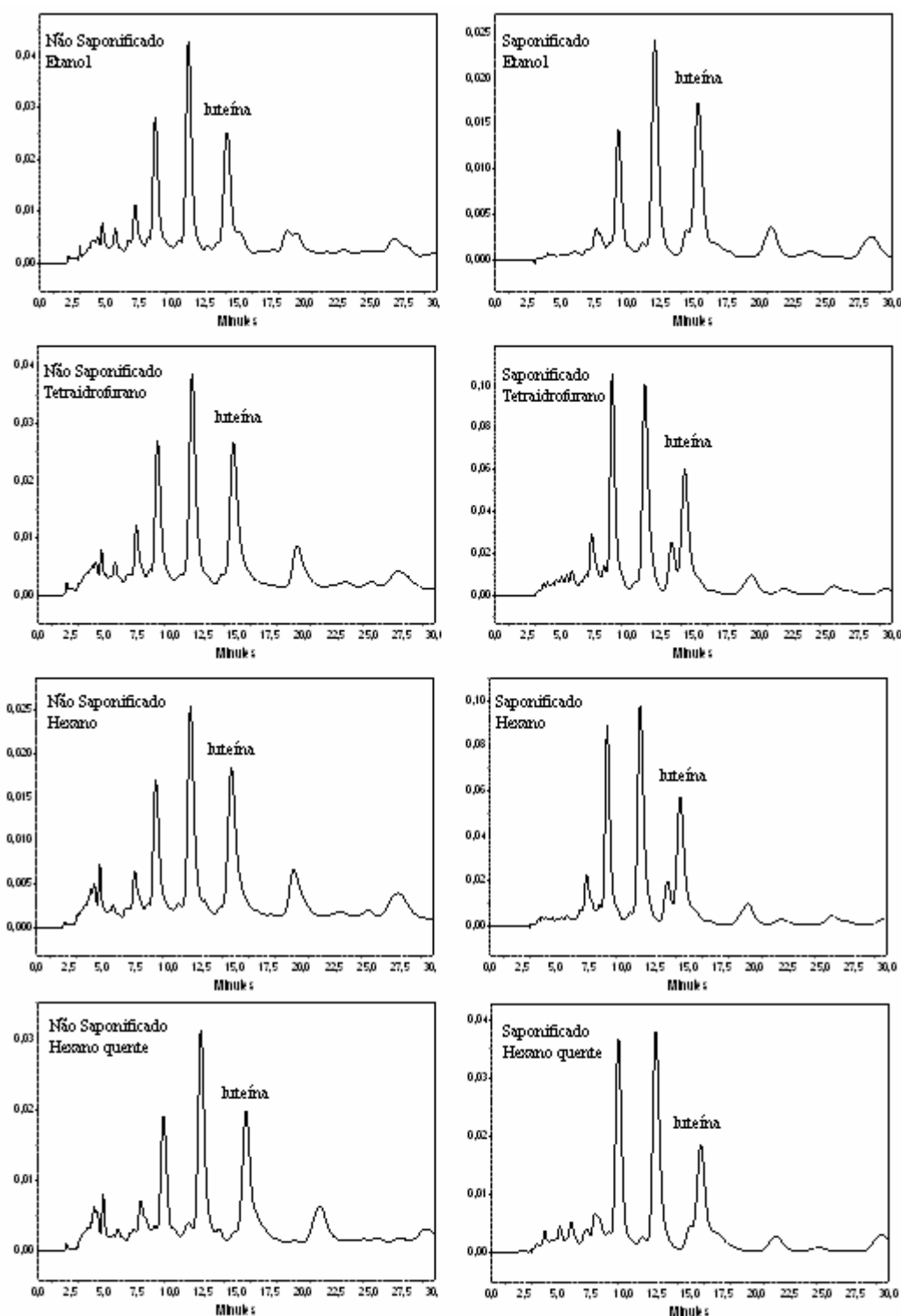


Figura 2 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos não saponificados e saponificados de flores de calêndula. Coluna polimérica C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm; Fase móvel: metanol (0,1% TEA)/ metil-tert-butil éter em modo isocrático e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Analisando o perfil cromatográfico dos extratos saponificados e não saponificados de tagetes e de calêndula, conforme ilustrado nas Figuras 1 e 2 verificou-se que a composição qualitativa e quantitativa diferiu pouco dentro da mesma espécie, no entanto, as duas espécies apresentaram perfil cromatográfico completamente diferenciado.

Fica nítido ao avaliar os cromatogramas das Figuras 1 e 2 e as Tabelas 4 e 5 que nos extratos saponificados de *T. patula* L. ocorreu um aumento da proporção de luteína e redução dos demais carotenóides. Já na espécie de calêndula percebe-se o aumento de outros carotenóides e não da luteína. Mello e Rodriguez-Amaya [20] ao trabalharem com extratos saponificados de flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonía trilobata*, com 10% de KOH metanólico, observaram um aumento significativo no pico de trans-luteína livre e o conseqüente desaparecimento ou diminuição dos picos de seus respectivos diésteres.

Tabela 4 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos não saponificados e saponificados de tagetes

Solvente	Sem Saponificação (%)	Com Saponificação (%)
Etanol a frio	63,7 Aa	74,1 Aba
Tetraidrofurano a frio	58,9 Ab	77,5 Aba
Hexano a frio	49,7 ABb	81,4 Aa
Hexano a quente	44,5 Bb	65,4 Ba

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 5 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos não saponificados e saponificados calêndula

Solvente	Sem Saponificação (%)	Com Saponificação (%)
Etanol a frio	20,2 Aa	24,6 Aa
Tetraidrofurano a frio	21,2 Aa	18,7 Aa
Hexano a frio	26,0 Aa	21,7 Aa
Hexano a quente	22,7 Aa	20,0 Aa

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A luteína apresentou-se como o carotenóide majoritário nas amostras de *T. patula* L., com porcentagens variando de 44,5% a 63,7% para as amostras sem saponificação e de 65,4% a 81,4% para as saponificadas (Tabela 4). Nota-se que a concentração de luteína nas amostras saponificadas superou, consideravelmente, o valor das amostras sem saponificação.

Os solventes apresentaram maior porcentagem (Tabela 4) e concentração de luteína (Tabela 2) após a saponificação de flores de tagetes. Mais uma vez mostrando a importância desta etapa na obtenção de luteína oriunda destas flores.

Piccaglia, Marotti e Grandi [25] verificaram que os ésteres de luteína representavam de 80 a 100% dos cromatogramas de extratos de flores de *T. erecta* L. e *T. patula* L., entre eles o mais abundante era dimiristato, miristato-palmitato, dipalmitato e palmitato-estearato. A cultivar *French champion orange* foi a que apresentou maior teor de luteína ( $570 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

Hadden et al. [14] determinaram a composição de carotenóides em um extrato comercial de flores de *T. erecta* contendo 4,5% de luteína na forma de ésteres. Após a saponificação deste extrato, verificou-se que 93% dos pigmentos eram biologicamente utilizáveis. Destes, 88% eram compostos por luteína na forma todo-E, pequenas quantidades da forma Z e resíduos da forma esterificada. O extrato continha ainda 5% de todo-E- e Z-zeaxantina, outros carotenóides minoritários e níveis insignificantes de produtos de degradação da luteína. A composição encontrada enfatizou a importância da utilização dos extratos comerciais de *T. erecta* em suplementos nutricionais e como corante em rações, pois mostrou que as formas de luteína biologicamente utilizáveis eram predominantes, enquanto que os níveis dos produtos de degradação da luteína estavam abaixo do esperado.

Delgado-Vargas e Paredes-Lopez [10] analisaram o extrato não saponificado e saponificado da farinha de flores de *T. erecta* e observaram que no primeiro havia diferentes isômeros de ésteres de luteína com predominância da forma todo-E, enquanto que o segundo era constituído por quatro isômeros de luteína na forma livre. Estes isômeros foram

identificados, tentativamente, como 13`Z-(13`-cis), 13Z-, todo-E- e 9Z- ou 9`Z-luteína.

A espécie de calêndula avaliada não se mostrou como uma boa fonte de luteína, diferindo do tagetes em todos os tratamentos. Além de apresentar uma percentagem baixa de luteína, a saponificação não surtiu o efeito desejado nas flores de calêndula (Tabelas 3 e 5). No entanto, os dados estão de acordo com os encontrados por Bakó, Deli e Tóth [3], que ao trabalharem com amostras de chá de calêndula (pétalas secas) constataram uma porcentagem de luteína variando entre 15 e 25% do total de carotenóides.

Na calêndula todos os tratamentos mostraram igual desempenho, independente do solvente e da etapa de saponificação. Portanto, a escolha da metodologia a ser seguida na extração de luteína desta espécie vegetal, dependerá única e exclusivamente do custo dos solventes e da simplicidade de execução da técnica.

#### **4 CONCLUSÃO**

Ao considerar-se o *T. patula* L. como fonte de luteína, faz-se necessária a etapa de saponificação. No entanto, a saponificação deve ser realizada conjunta à extração, visando reduzir as perdas por danos oxidativos e o tempo gasto na obtenção das oleoresinas.

Ao trabalhar com *C. officinalis* L. não é necessário realizar a saponificação, o que estaria acarretando em gasto de tempo e tornando o processo mais oneroso, sem uma contribuição real em termos de teor de luteína.

#### **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ABOU-EL-MAATI, S.M.; ABD-ELLATIF, E. Studies on carotenoid pigments isolated from petals of *Calendula officinalis* as food colouring agents. IN: Food Science Symposium, University of Alexandria, Egypt, p. 140-149, 1992.

2. ALEMAN, T.S. et al. Macular pigment and lutein supplementation in retinitis pigmentosa and usher syndrome. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, p.1873-1881, 2001.
3. BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. **J. Biochem. Biophys. Methods.**, n. 53, p. 241–250, 2002.
4. BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: pigment for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell.**, v. 7, p. 1027-1038, 1995.
5. BOWEN, P.E. et al. Evaluation of bioavailability of lutein and lutein diesteres in humans. **FASEB J.**, v. 11, p. 2587, 1997.
6. BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 517-524, 1999.
7. CHASAN-TABER, L. et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 509-516, 1999.
8. CISNEROS, M. et al. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoide*. **J. Chromatogr. B**, s. n., s. p., 2004.
9. DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T. M. Lutein improves visual function in some patients whit retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, v. 71, p. 147-164, 2000.
10. DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Effect of enzymatic treatments of marigold flowers (*Tagetes erecta*). **Food Chem.**, v. 58, p. 255-258, 1997.
11. DELI, J. et al. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 925-928, 2004.
12. DUQUE, F.L.V. **Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco.** Disponível em: <http://www.artériosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/2/Atualizacaop50.htm>. Acesso em: 20 maio 2006.

13. GRANADO, F. et al. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. **J. Food comp. Anal.**, v. 14, p. 479-489, 2001.
14. HADDEN, W.L. et al. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4189-4194, 1999.
15. HART, D.J.; SCOTT, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, v. 54, p. 101-111, 1995.
16. KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA D.B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.**, v. 78, p. 389-398, 2002.
17. LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, n. 1, p. 28-40, 2001.
18. LUTEIN and zeaxanthin in the eye. Disponível em: [http://www.dsm.com/en\\_US/html/dnpus/di\\_lutein\\_scientific2.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dnpus/di_lutein_scientific2.htm). Acesso em: 25 set. 2006.
19. MANUAL MERCK. **Distúrbio do olho**. Disponível em: [www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec20\\_225.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec20_225.htm). Acesso em: 25 set. 2006.
20. MELLO, M.C. de **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenóides**. 2002, 113 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
21. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: \_\_\_\_\_. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Chicago: CRC Press LLC, 2002. cap. 3.
22. MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 640-644, 1994.
23. NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z. utilização de colunas de fase reversa C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> para separação de carotenóides por CLAE. In: CONGRESSO

- BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD-Rom.
24. PARK, J.S.; CHEW, B. P.; WONG, T. S. Effect of dietary lutein on growth of mammary tumor in BALB/c mice. **FASEB J.**, v. 11, p. 2586-2594, 1997.
25. PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GRANDI, S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. **Ind. Crops Prod.**, v. 8, p. 45–51, 1998.
26. SÁ, M.C. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.**, v. 83, p. 595-600, 2003.
27. SEDDON, J. M. et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 272, p. 1413-1420, 1994.
28. SEO, J. S. et al. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. **J. Chromatogr.**, n. 1073, p. 371–375, 2005.
29. SOWBHAGYA, H.B.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N. Natural colorant from marigold chemistry and technology. **Food Rev. Int.**, v. 20, n. 1, p. 33-50, 2004.
30. VALDÈS, H. L.; GARCÌA, R. P. *Calendula officinalis*. **Rev Cubana Farm.**, n.33, p. 188-194. 1999.
31. YEUM, K. et al. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherol in human lenses. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.

# EFEITO DO SOLVENTE EXTRATOR SOB O TEOR DE LUTEÍNA EM FLORES DE *Tagetes patula* L. E *Calendula officinalis* L.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho dos solventes na extração de luteína a partir de pétalas de *Tagetes patula* L. (tagetes) e *Calendula officinalis* L. (calêndula). Para tanto, foram utilizados três solventes, etanol, tetraidrofurano e hexano. A extração foi realizada a frio durante 24 h com os três solventes separadamente e a quente com hexano em aparato soxhlet com 7 h de extração dinâmica, seguida de extração estática “over night” e mais 1 h de extração dinâmica. Todos os extratos foram submetidos a saponificação simultânea com KOH etanólico 10% (p/v) na proporção 1:1 em relação ao extrato. O teor de luteína e a caracterização do comportamento cromatográfico das flores foram determinados pelo seu espectro no visível e perfil em CLAE. Os solventes apresentaram poder de extração diferenciado de acordo com a espécie empregada ( $p \leq 0,05$ ). Para o tagetes os melhores solventes extratores foram o tetraidrofurano e o hexano, com teores de luteína de 1220,0 mg.100 g<sup>-1</sup> de pétalas secas e 893,9 mg.100 g<sup>-1</sup> de pétalas secas, respectivamente. O emprego da temperatura além de provocar a degradação dos pigmentos proporcionou extratos com menor pureza. Na calêndula o solvente extrator não teve um efeito significativo sobre o teor de luteína extraído. Desta forma, fica evidente que na extração de luteína de flores de tagetes, devem-se empregar os solventes tetraidrofurano ou hexano ambos a frio, já ao utilizar flores de calêndula como fonte do mesmo carotenóide o emprego do solvente fica condicionado ao que apresentar melhor custo benefício.

**Palavras-chave:** *Tagetes patula* L.; *Calendula officinalis* L.; luteína; solventes.

## SUMMARY

EFFECTS OF THE EXTRACTION SOLVENT OVER THE CONTENTS OF LUTEIN IN FLOWERS OF *Tagetes patula* L. AND *Calendula officinalis* L. The objective of the present work was to evaluate the acting of the solvents in the lutein extraction starting from *Tagetes patula* L. (african marigold) petals and *Calendula officinalis* L. (marigold) petals. For this purpose, the following three solvents were used: ethanol, tetrahydrofurane and furane. The extraction was carried out with the three separately solvents, in cold, for 24 hours. A hot extraction using only the hexane solvent was conducted in a soxhlet apparatus in which a dynamic extraction took place for 7 hours, followed by an overnight static extraction and an extra hour of a dynamic extraction. All of the extracts were submitted to a simultaneous saponification with a solution of 10% w/w KOH in ethanol. The contents of lutein and characterization of the chromatographic profile of the flowers were determined by UV-visible spectra and HPLC. The solvents exhibited differentiated extraction activities which varied depending on the solvent used in the process ( $p \leq 0.05$ ). The best exctration solvents utilized in the african marigold were the tetrahydrofurane and hexane, with tenors of lutein of 1220,0 mg.100 g<sup>-1</sup> 893.9 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectively. Not only the use of temperature caused the degradation of the pigments but it also provided less pure extracts. In the marigold the solvent extractor didn't have a significant effect on the tenor of extracted lutein. Therefore, it can be inferred that the tetrahydrofurane and hexane, both in cold, should be the choosen solvents whenever extracting lutein from african marigold flowers. As for marigold flowers as sources of lutein, the designated solvent to extract the highest amounts of carotenoids should be the one that is able to provide the best cost-benefit.

**Key words:** *Tagetes patula* L.; *Calendula officinalis* L.; lutein; solvents.

## 1 INTRODUÇÃO

A luteína, carotenóide macular de coloração amarela, é um potente antioxidante que previne os danos causados por radicais livres nos tecidos [2, 29, 30]. Dos principais benefícios associados à luteína, além das evidências na redução do risco de desenvolvimento da degeneração macular relacionada a idade (DMRI), destacam-se os efeitos benéficos na proteção contra a aterosclerose, a catarata, o câncer e outras doenças [2, 7, 8, 13, 14, 19, 35]. A luteína apresenta propriedades anti-apoptoses *in vitro*, que auxiliam na prevenção de câncer de fígado, cólon entre outros [11], protege as células contra danos no DNA e estimula a comunicação das junções gap [11, 22, 35]

Estudos toxicológicos têm confirmado que a luteína é segura. O enriquecimento de alimentos pode ser realizado com êxito sem que ocorram mudanças nos demais ingredientes e sem impacto às propriedades sensoriais do produto final [2, 11, 15, 20]. Assim, a ingestão de alimentos enriquecidos com luteína extraída de flores de tagetes e de calêndula pode elevar o consumo diário de luteína a níveis suficientes para redução das doenças degenerativas [2].

Na literatura encontra-se uma diversidade de solventes extratores para luteína em diferentes fontes vegetais. Em vegetais verdes pode-se extrair este carotenóide empregando uma mistura de iguais proporções de tetraidrofurano/metanol [6, 16, 18, 21, 27], ou a mistura dos solventes acetona/éter dietílico/água [34], ou ainda uma solução extratora de clorofórmio/metanol, contendo duas partes de clorofórmio para uma de metanol [33]. Já em frutas tropicais e hortaliças cruas e cozidas, observa-se o emprego de acetona como solvente extrator [4, 17, 28, 36]. Por fim, na extração de luteína de flores de *T. erecta* L. pode-se encontrar o uso dos solventes hexano [31] e da mistura de acetona/hexano na proporção 80:20 [30]

Segundo CRAFT [10], a luteína apresenta excelente solubilidade em tetraidrofurano e reduzida em hexano. No entanto, apesar da baixa solubilidade do referido carotenóide em hexano, este solvente é largamente empregado na extração industrial de luteína de flores de tagetes, uma vez

que o hexano é seletivo para os ésteres de luteína. Este solvente pode ser empregado também, nas etapas de purificação [3].

Considerando a diversidade de solventes encontrados em literatura para extração de luteína e sua inquestionável colaboração para a manutenção da saúde, o presente trabalho teve por objetivo verificar o desempenho dos solventes etanol, tetraidrofurano e hexano na extração deste carotenóide ao empregar flores de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L. como fonte de luteína.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Flores marrons de *Tagetes patula* cv. *French Marigold* cultivar Flame e laranjas de *Calendula officinalis* L. foram cultivadas no Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais, do Departamento de Fitotecnia (DF), da Universidade Federal de Viçosa – MG. As plantas foram cultivadas a pleno sol e no plantio foram fertilizadas com 50L.m<sup>-2</sup> de matéria orgânica, 50g.m<sup>-2</sup> de nitrogênio na forma de sulfato de amônio, 150 g.m<sup>-2</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples e 20 g.m<sup>-2</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio. Após a coleta das flores, no período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005, estas foram classificadas e separadas em lotes de acordo com a coloração das pétalas. Suas flores centrais e periféricas foram destacadas e homogeneizadas. As flores foram secas em secador de circulação de ar, marca Paralex, modelo Excalibur Food Dehydration, à temperatura de 60 °C por 3 h. As pétalas secas, com umidade final de 10%, foram trituradas em triturador de alimentos e armazenadas em freezer doméstico (-18 ± 2 °C). O peso das amostras submetidas a análise variou em torno de 1 g para cada lote.

### 2.2 Extração e saponificação

A extração dos pigmentos foi realizada a frio com três solventes extratores: etanol, tetraidrofurano e hexano. O hexano, após testes preliminares, foi selecionado para ser empregado, também, na extração a quente. A extração a frio procedeu-se na ausência de luz e em temperatura

ambiente por 24h. A extração a quente foi realizada com hexano em sistema soxhlet, sendo efetuada em três etapas: extração dinâmica por setes horas, extração estática “over night” (solvente em contato com a amostra) e para finalizar extração com mais 1 h em etapa dinâmica. A saponificação foi realizada simultânea a extração utilizando uma solução etanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. Os extratos foram filtrados e transferidos para éter de petróleo. A retirada completa do álcali e do solvente foi realizada através de sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados foram concentrados em evaporador rotatório à temperatura máxima de 35 °C e logo após secos em fluxo suave de nitrogênio.

### **2.3 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína**

A identificação do carotenóide majoritário nas amostras foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por NUNES & MERCADANTE [23], empregando-se o cromatógrafo líquido Shimadzu CLASS-VP.

A confirmação da presença da luteína baseou-se na avaliação conjunta do perfil em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio do tempo de retenção e co-cromatografia com padrão autêntico de luteína, e espectro de absorção no visível obtido em espectrofotômetro HITACHI U-2001.

Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm), utilizando metanol (0,1% de trietilamina)/metil-tert-butil éter 95:5 como fase móvel, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em modo isocrático, injeção de 30 µL, sendo os cromatogramas obtidos a 450 nm.

Os solventes utilizados, todos grau cromatográfico, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana de 0,45 µm, apropriada para solvente orgânico e, a seguir, degaseificados em ultra-som. As amostras foram ressuspendidas em 2 mL de metil-tert-butil éter e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 µm de poro.

Os espectros de absorção no visível foram obtidos seguindo metodologia descrita por CISNEROS [9]. Os extratos foram ressuspendido em etanol absoluto e a leitura foi realizada a 445 nm.

A quantificação do teor de luteína nas amostras foi efetuada por CLAE empregando padrão externo. A curva de calibração foi construída com seis pontos e a faixa de concentração utilizada foi de 0,002 a 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância e Teste de Tukey para diferença entre médias ao nível de 5% de confiabilidade, com auxílio do Software SAEG.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações no solvente extrator provocaram variações significativas no teor de luteína dos extratos de *T. patula* L., o que não foi verificado nas amostras de *C. officinalis* L. (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor médio de luteína nas amostras saponificadas de tagetes e calêndula (mg.100 g de pétalas secas<sup>-1</sup>)

Solvente	Teor de luteína (mg.100 g <sup>-1</sup> )	
	Tagetes	Calêndula
Etanol a frio	266,5 Ca	4,2 Ab
Tetraidrofurano a frio	1220,0 Aa	30,1 Ab
Hexano a frio	893,9 Ba	31,2 Ab
Hexano a quente	415, 5 Ca	10,3 Ab

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para fator solvente dentro de cada espécie. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator espécie dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Os dados são em parte justificados pelos resultados obtidos por Craft [10] ao avaliar a solubilidade da luteína em diferentes solventes. Segundo o autor supracitado era esperado que o tetraidrofurano extraísse um teor superior do pigmento, por apresentar poder de solubilização 27 vezes o do etanol e 400 vezes o do hexano. No entanto, a maior concentração de luteína nas oleoresinas extraídas com hexano a frio comparadas as

extraídas com etanol pode ser justificada pelo elevado teor de ésteres de luteína encontrado nas flores de *T. patula* L.

A extração com hexano a quente apresentou resultados inferiores à extração com hexano a frio, possivelmente, pela degradação dos carotenóides devido à alta temperatura. Sendo assim, a extração a quente não apresentou vantagens, o que desaconselha o seu emprego na extração de luteína de flores secas de *T. patula* L.

Analisando ainda, o poder extrator dos solventes nas flores de *T. patula* L., notou-se que o solvente com menor eficiência foi o etanol. Este fato pode ser justificado pela baixa solubilidade da luteína em etanol [10].

Piccaglia, Marotti e Grandi [26] ao extraírem luteína de flores de tagetes, empregando hexano em aparelho Soxhlet, observaram que a cultivar de *T. patula champion orange* apresentou maior teor de luteína (570,00 mg.100 g<sup>-1</sup>) em relação a *champion gold* (98,91 mg.100 g<sup>-1</sup>) e a *champion yellow* (94,37 mg.100 g<sup>-1</sup>). Os resultados encontrados para a variedade *champion orange* estão de acordo com os dados obtidos no presente trabalho.

O teor de luteína no *T. patula* L. extraído com tetraidrofurano é semelhante ao valor encontrado por Delgado-Vargas e Paredes-Lopez [12] em *T. erecta* L. ao empregar hexano e acetona como solventes extratores. Os autores ao avaliarem o efeito do tratamento com enzimas que apresentavam atividade glicosídica, de celulase, de hemicelulase e de pectinase, reportaram um total de carotenóides de 1.140 a 1.740 mg.g<sup>-1</sup> e 1.800 a 2.470 mg.g<sup>-1</sup> em *T. erecta* L. desidratados sem e com tratamento enzimático, respectivamente.

Ao avaliar o efeito dos solventes extratores na espécie de *C. officinalis* L. estudada percebeu-se que os solventes, etanol, tetraidrofurano e hexano, apresentaram igual poder extrator independente da temperatura empregada no processo.

O comportamento dos extratos de tagetes e calêndula frente aos solventes extratores são confirmados pelos seus respectivos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 1 e 2.

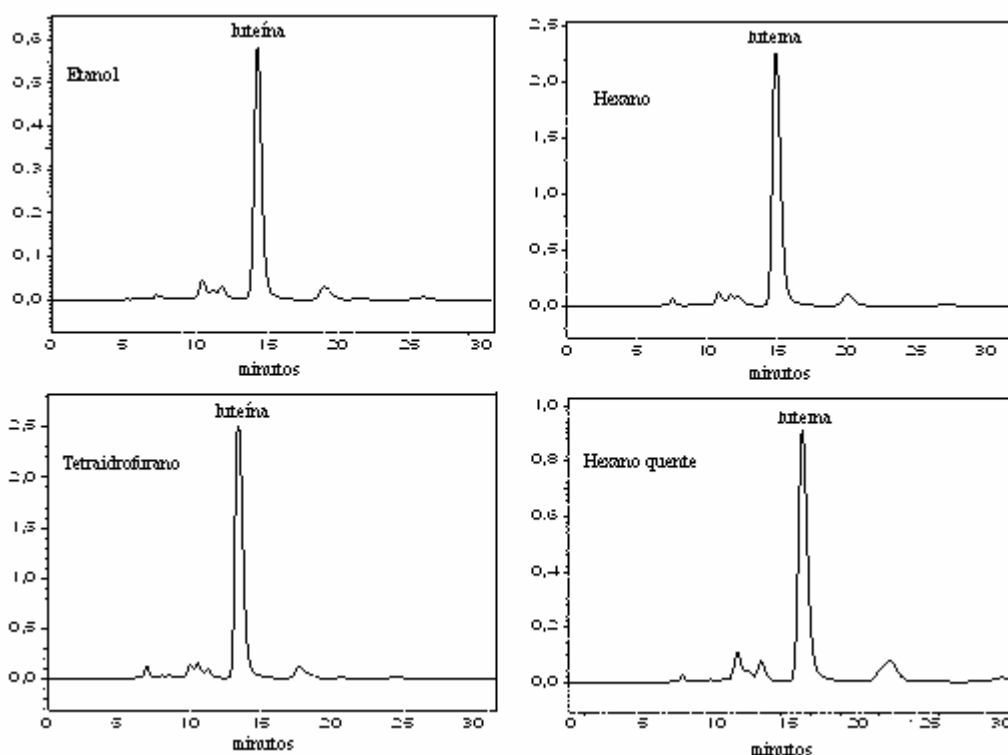


Figura 1 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de *T. patula* L. Coluna polimérica C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Fase móvel: metanol (0,1% TEA)/metil-terc-butil éter em modo isocrático e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Os perfis cromatográficos dos diferentes extratos de *T. patula* L. apresentaram comportamento muito semelhante. No entanto, ao avaliar o efeito da temperatura pode-se visualizar que o extrato de hexano a quente contém proporções maiores de outros carotenóides em relação ao extrato de hexano a frio, este fato fica evidente ao observar os dados da Tabela 2. Assim, o emprego da temperatura, além de provocar a degradação dos pigmentos, proporciona extratos com menor pureza.

Analisando os perfis cromatográficos dos extratos saponificados de *T. patula* L. e de *C. officinalis* L. (Figuras 1 e 2), verificou-se que a composição qualitativa e quantitativa diferiu pouco dentro da mesma espécie.

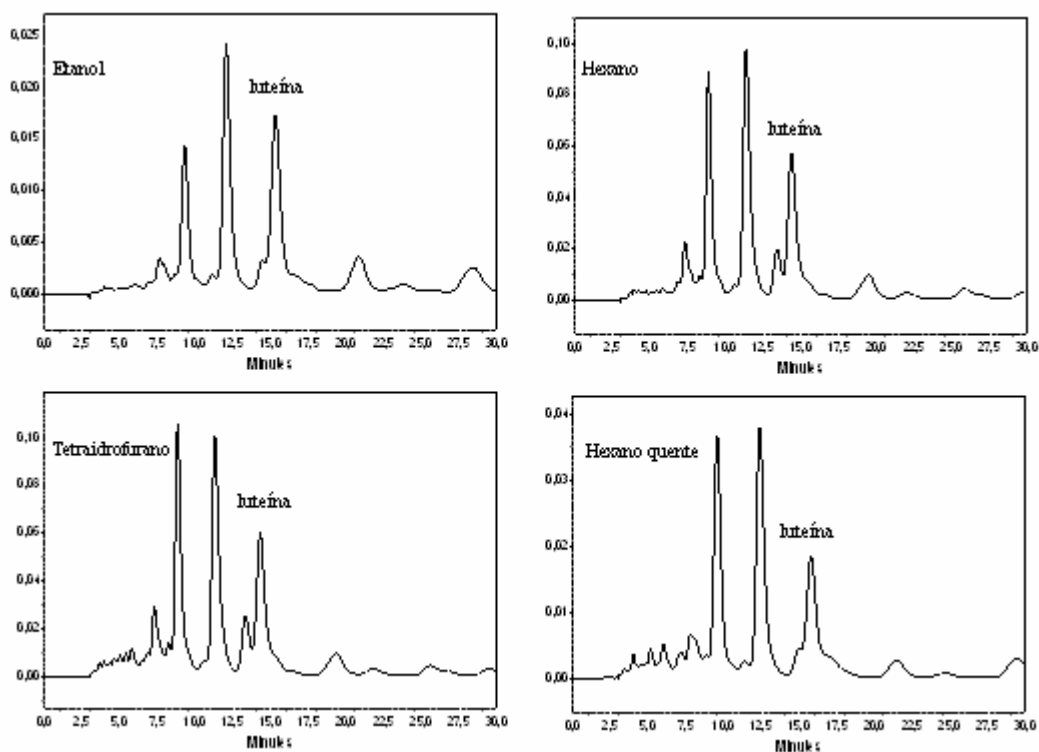


Figura 2 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos saponificados das flores de *C. officinalis* L. Coluna polimérica C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm; Fase móvel: metanol (0,1% TEA)/metil-tert-butil éter em modo isocrático e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Ao observar os cromatogramas dos extratos de *C. officinalis* L., pôde-se notar que o tetraidrofurano a frio e o hexano a quente extraíram uma quantidade maior de outros carotenóides que não eram luteína (Figura 2 e Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de luteína do total de carotenóides nos extratos saponificados de *T. patula* L. e *C. officinalis* L.

Solvente	% de luteína	
	Tagetes	Calêndula
Etanol a frio	74,1 Aba	24,6 Ab
Tetraidrofurano a frio	77,5 Aba	18,7 Ab
Hexano a frio	81,4 Aa	21,7 Ab
Hexano a quente	65,4 Ba	20,0 Ab

\*Letras maiúsculas distintas na coluna evidenciam diferença significativa para fator solvente dentro de cada espécie. Letras minúsculas distintas na linha evidenciam diferenças do fator espécie dentro de cada solvente, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A luteína apresentou-se como o carotenóide majoritário nas amostras de *T. patula* L., com porcentagens variando entre 65,4% e 81,4%, concordando com trabalhos de Philip e Berry [25], que afirmam que a luteína é o pigmento majoritário responsável pela coloração das flores de tagetes (60% do total de carotenóides presentes). Os dados estão de acordo também com a revisão realizada por Peña et al. [24], em que os autores constataram que em extratos de *T. erecta* L., após a saponificação com NaOH a 90°C, 80-90% dos carotenóides eram luteína, 5% zeaxantina e 5 a 15% outros carotenóides, como violaxantina e criptoxantina.

Com respeito a *C. officinalis*, Valdés e Garcia [32] afirmam que suas flores são compostas pelos carotenóides  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentixantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epóxi-caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno, mutatoxantina e epóxido de luteína. No entanto, Abou-EI-Maati e Abd-Ellatif [1] não citaram a presença de luteína em flores de calêndula. Após analisarem os carotenóides presentes nas mesmas, os autores identificaram  $\beta$ -caroteno, licopeno, violaxantina, anterxantino e canxantina, sendo  $\beta$ -caroteno o mais abundante (22,9%).

Os dados do trabalho atual são diferentes dos encontrados por Abou-EI-Maati e Abd-Ellatif [1], pois a presença da luteína foi confirmada com proporções variando entre 18,7 e 24,6%, mesmo não sendo o carotenóide majoritário desta espécie. No entanto, estão de acordo com estudos de Bakó, Deli e Tóth [5], que ao trabalharem com amostras de chá de calêndula (pétalas secas) constataram um teor de luteína variando entre 15 e 25%.

A espécie de calêndula, coletada na época de verão, não se mostrou como uma boa fonte de luteína, diferindo do tagetes em todos os tratamentos.

O solvente mais eficiente para extração de luteína de *T. patula* L. foi o tetraidrofurano e o aquecimento reduziu significativamente o teor de luteína dos extratos. Como os tratamentos efetuados nas flores de calêndula mostraram igual desempenho, a escolha da metodologia a ser seguida na extração de luteína desta fonte vegetal dependerá única e exclusivamente do custo dos solventes e da facilidade de execução da técnica.

## 4 CONCLUSÃO

A escolha do solvente extrator tem um papel fundamental na extração de carotenóides, tanto quando se refere às questões quantitativas como qualitativas. O perfil de carotenóides extraídos foi influenciado pela polaridade dos solventes, os quais apresentaram comportamento diferenciado com relação à espécie empregada como fonte de luteína. A calêndula não sofreu influência do sistema extrator e o melhor processo para extração de luteína de flores de tagetes é o que emprega o solvente tetraidrofurano a frio.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-EL-MAATI, S.M.; ABD-ELLATIF, E. Studies on carotenoid pigments isolated from petals of *Calendula officinalis* as food colouring agents. IN: Food Science Symposium, University of Alexandria, Egypt, p. 140-149, 1992.
2. ALEMAN, T. S. et al. Macular pigment and lutein supplementation in Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.42, p.1873-1881, 2001.
3. ANTONY, J.I.X.; SHANKARANARAYANA, M.L. Lutein: a natural colourant and phytonutrient for eye health protection. **World Food Ingr.**, p. 64-67. apr./may, 2001.
4. AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Comp. Anal.**, v. 17, p. 385-396, 2004.
5. BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. **J. Biochem. Biophys. Methods.**, n. 53, p. 241–250, 2002.
6. BEN-AMOTZ, A.; FISHLER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis  $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. **Food Chem.**, v. 62, n. 4, p. 515-520, 1998.
7. BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract in US men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 517-524, 1999.

8. CHASAN-TABER, L. et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 509-516, 1999.
9. CISNEROS, M. et al. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoide*. **J. Chromat. B**, s. n., s. p., 2004.
10. CRAFT, N. E. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and  $\beta$ -carotene in organic solvents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p.431-434, 1992.
11. DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T. M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optom.**, v. 71, p. 147-164, 2000.
12. DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Effect of enzymatic treatments of marigold flowers (*Tagetes erecta*). **Food Chem.**, v. 58, p. 255-258, 1997.
13. DELI, J. et al. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 925-928, 2004.
14. DUQUE, F.L.V. **Aterosclerose: aterosclerose e fatores de risco.** Disponível em: <http://www.artériosclerose.med.br/revistas/sbacvrj/1998/2/Atualizacaoop50.htm>. Acesso em: 20 maio 2006.
15. HADDEN, W. L. et al. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4189-4194, 1999.
16. HART, D.J.; SCOTT, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, v. 54, p. 101-111, 1995.
17. KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.**, v. 78, p. 389-398, 2002.
18. KONINGS, E.J.M.; ROOMANS, H.H.S. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit. **Food Chem.**, v. 59, n. 4, p. 599-603, 1997.

19. LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, n. 1, p. 28-40, 2001.
20. LICOPENO, Luteína e zeaxantina: mais do que potentes antioxidantes. **Aditiv. Ingrid.**, v. 24, p.48-61, 2003.
21. LIENAU, A. et al. Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. **J. Nutrit. Biochem.**, v. 11, p. 663–670, 2003.
22. MANUAL MERCK. **Distúrbio do olho**. Disponível em: [www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec20\\_225.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec20_225.htm). Acesso em: 25 set. 2006.
23. NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z: utilização de colunas de fase reversa C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> para separação de carotenóides por CLAE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD-Rom.
24. PEÑA, M.M.; CUEVAS, A.C.; GONZÁLEZ, E.A. Evaluación de tres niveles de pigmento de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentación de la piel em pollos de engorda. **Téc. Pecu. Méx.**, v 42, n. 1, p. 105-111, 2004.
25. PHILIP, T.; BERRY, J.W. Nature of lutein acylation in marigoldi (*Tagetes erecta*) flowers. **J. Food. Sci.**, v. 40, p. 1089-1090, 1975.
26. PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GRANDI, S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. **Ind. Crops Prod.**, v. 8, p. 45–51, 1998.
27. RISO, P. et al. Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 14, p.150-56, 2004.
28. SÁ, M.C. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.**, v. 83, p. 595-600, 2003.
29. SEDDON, J. M. et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E and advanced age-related macular degeneration. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 272, p. 1413-1420, 1994.
30. SHOWBHAGIA, H.B.; SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N. Natural colorant from marigold-chemistry and technology. **Food Rev. Int.**, v. 20, n. 1, p. 33-50, 2004.

31. TSAO, R. et al. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1045, p. 65–70, 2004.
32. VALDÈS, H. L.; GARCÌA, R. P. *Calendula officinalis*. **Rev Cubana Farm.**, n.33, p. 188-194. 1999.
33. VARDAVAS, C. I. et al. The antioxidant and phyloquinone content of wildy grown greens in Crete. **Food Chem.**, n. x, p. xxx–xxx,2005.
34. WILL, R. B. H.; RANGGA, A. Determination of carotenoids in Chinese vegetables. **Food Chem.**, v. 56, n. 4, p. 451-455, 1996.
35. YEUM, K. et al. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherol in human lenses. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.
36. ZHANG D.; HAMAUZU Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chem.**, v. 88, p. 503–509, 2004.

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE LUTEÍNA  
PROVENIENTE DE FLORES DE *Tagetes patula* L. E  
*Calendula officinalis* L.**

**RESUMO**

O efeito do solvente extrator e da saponificação sobre a capacidade antioxidante dos extratos de luteína obtidos de flores de *Tagetes patula* L. (tagetes) e *Calendula officinalis* L. (calêndula) foi avaliado pelo teste do radical livre DPPH e pela inibição da oxidação do ácido linoléico em emulsão com  $\beta$ -caroteno. Os extratos foram obtidos mediante extração com os solventes: etanol, tetraidrofurano e hexano por 24 h ao abrigo da luz, sendo a extração com hexano realizada, também, a quente em aparato Soxhlet com 7 h de extração dinâmica, seguida de extração estática *over night* e 1 h de extração dinâmica. A saponificação foi efetuada simultânea a extração com KOH etanólico 10%. Os extratos que apresentaram menor valor de  $EC_{50}$ , ou seja, maior capacidade de seqüestro do radical DPPH foram os de tagetes extraídos com etanol não saponificado ( $0,044 \text{ g.mmol DPPH}^{-1}$ ) e o saponificado extraído com tetraidrofurano ( $0,068 \text{ g.mmol DPPH}^{-1}$ ), bem como, os de calêndula extraídos com tetraidrofurano independente da saponificação ( $0,004$  e  $0,015 \text{ g.mmol DPPH}^{-1}$ ). As maiores porcentagem de inibição à oxidação lipídica foram observadas nos extratos não saponificados de tagetes e calêndula extraídos com tetraidrofurano (72,22% e 72,97%). O tetraidrofurano foi o solvente que de uma forma geral apresentou extratos mais efetivos quanto à proteção da oxidação, sendo que a saponificação contribuiu para a redução desta capacidade. Além da luteína outros compostos contribuíram para a ação antioxidante das oleoresinas. As flores estudadas podem ser consideradas fontes promissoras de compostos biologicamente ativos com propriedades antioxidantes.

**Palavras-chave:** tagetes; calêndula; luteína; antioxidante.

## SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF LUTEIN OBTAINED FROM FLOWERS OF *Tagetes patula* L. AND *Calendula officinalis* L. The effect of the extraction solvents and saponification process about antioxidant capacity of the extracts of lutein obtained from *Tagetes patula* L. (african marigold) and *Calendula officinalis* L. (marigold) flowers, were evaluated through the free radical DPPH test and inhibition of the oxidation of linoleic acid in emulsions with  $\beta$ -caroten. The extracts were obtained by extraction with solvents: ethanol, tetrahydrofurane and hexane for 24 hours, without light exposure. The extraction solvent hexane was also used, in hot, in a soxhlet apparatus in which a dynamic extraction took place for 7 hours, followed by an overnight static extraction and an extra hour of a dynamic extraction. A saponification using 10% KOH in ethanol was carried out simultaneously to the extraction. The extracts that presented smaller value of  $EC_{50}$ , in other words, greatest capacity of capturing DPPH radicals were the ones african marigold extracted with ethanol, in cold, without saponification (0,044 g.mmols de  $DPPH^{-1}$ ) and the saponified ones extracted with tetrahydrofurane (0,068 g.mmols de  $DPPH^{-1}$ ), also in cold, as well as the one of extracted the marigold with tetrahydrofurane independent of the saponification (0,004 e 0,015 g.mmols de  $DPPH^{-1}$ ). Already the ones that presented them largest inhibition percentage to the oxidation lipidic were the african marigold extracts and calendula no saponified, with inhibitions of 72,22% and 72,97%, respectively. The tetrahydrofurane was the solvent that in general presented more effective extracts as for the protection of the oxidation, and the saponification contributed to the reduction of this capacity. Besides the lutein other compositions contributed to the antioxidant action of the oleoresins. The studied flowers can be considered promising sources of composed assets biologically with antioxidant properties.

**Key words:** african marigold; marigold; lutein; antioxidant.

## 1 INTRODUÇÃO

Na última década o estudo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os seus papéis em um grande número de doenças, revelaram que substâncias antioxidantes são capazes de prevenir os efeitos do estresse oxidativo [21]. Este resultados geraram um considerável interesse das indústrias de alimentos [3] e da medicina preventiva no desenvolvimento de “antioxidantes naturais” provenientes de material vegetal [25].

A literatura apresenta a atividade antioxidante de flores de *Tagetes erecta* associada à frações de carotenóides, especialmente a presença de luteína. A luteína, carotenóide diidroxilado pertencente a classe das xantofilas de coloração amarela [14], atua como antioxidante protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduz o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, uma vez que o estresse oxidativo e a atuação dos radicais livres são os maiores fatores associados à iniciação e propagação do desenvolvimento destas doenças [10, 20, 22, 23, 26, 28, 30].

Dos principais benefícios associados a luteína, além de prevenir a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), destaca-se a prevenção de aterosclerose, catarata, câncer entre outras doenças [1, 7, 8, 9, 27]. Estes benefícios decorrem da atividade antioxidante da luteína, a qual consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos [19, 26, 30]. Por exercer funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueia os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas [24].

O princípio da proteção conferida pela luteína contra reações de fotossensibilização baseia-se num mecanismo de transferência de energia, que devolve o oxigênio singlete ao seu estado basal. O retorno da luteína triplete ao seu estado original, pela dissipação de energia na forma de calor, torna possível a reação com outro oxigênio singlete [11, 14, 26].

Por transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou por adição as reações em cadeia dos radicais peróxidos podem ser interrompidas pelos carotenóides [10, 26]. De acordo com Fontana et al. [11], sob uma tensão adequada de oxigênio o curso das reações se completa, visto que a

concentração de oxigênio gera um efeito significativo na atividade antioxidante dos carotenóides. Em baixas concentrações de oxigênio os carotenóides apresentam comportamento antioxidante e caráter pro-oxidante em concentrações elevadas [10].

A estrutura, a polaridade média e a reatividade dos carotenóides devem ser consideradas ao avaliar sua capacidade antioxidante [10]. De acordo com Shami & Moreira [24], a ação seqüestrante de radicais livres é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenóides. Segundo Mello [15], para apresentar função como antioxidante e apresentar proteção máxima, os carotenóides devem possuir no mínimo nove ligações duplas conjugadas.

Medidas via fotoemissão indicam que a capacidade de seqüestro de oxigênio singlete por parte de carotenos e xantofilas é máxima para o licopeno, alta para astaxantina ou cantaxantina, intermediária para  $\beta$ -caroteno ou bixina e menor para luteína e crocina [11].

No entanto, WANG et al. [31] investigando a atividade antioxidante da luteína usando fotoquimioluminescência e o sistema modelo de  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, concluíram que a luteína apresentava poder antioxidante superior ao  $\beta$ -caroteno e ao licopeno, e que ao empregar o teste da oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico a luteína foi o único carotenóide que mostrou inibição da peroxidação.

Tendo-se conhecimento da série de benefícios relacionados a luteína e que estes estão associados ao seu poder antioxidante, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antioxidante de extratos de *Tagetes patula* L. e de *Calendula officinalis* L. extraídos com três solventes diferentes, saponificados e não saponificados, utilizando o teste do radical DPPH e o teste da oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Flores marrons de *Tagetes patula* cv. French Marigold cultivar *Flame* e laranjas de *Calendula officinalis* L. foram cultivadas no Setor de Floricultura e Plantas Ornamentais, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, MG. As plantas foram desenvolvidas a pleno sol e no plantio foram fertilizadas com 50 L.m<sup>-2</sup> de matéria orgânica, 50 g.m<sup>-2</sup> de nitrogênio na forma de sulfato de amônio, 150 g.m<sup>-2</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples e 20 g.m<sup>-2</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio. Após a coleta das flores, no período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005, estas foram classificadas e separadas em lotes de acordo com a coloração das pétalas. Suas flores centrais e periféricas foram destacadas e homogeneizadas. As flores foram secas em secador de circulação de ar, marca Paralex, modelo Excalibur Food Dehydration, à temperatura de 60 °C por 3 h. As amostras secas, com umidade final de 10%, foram trituradas em triturador de alimentos e armazenadas em freezer doméstico (-15 ± 2 °C). Utilizou-se aproximadamente 1 g de amostra para cada lote.

### 2.2 Extração e saponificação

A extração dos pigmentos foi realizada a frio com três solventes: etanol, tetraidrofurano e hexano, sendo que o hexano foi empregado, também, na extração a quente. A extração a frio procedeu-se na ausência de luz e em temperatura ambiente por 24 h. A extração a quente foi realizada com hexano em sistema soxhlet, sendo efetuada em três etapas: extração dinâmica por setes horas, extração estática *over night* (solvente em contato com a amostra) e para finalizar, extração por mais 1 h em etapa dinâmica. Parte dos extratos foram saponificados e a outra parte foi utilizada sem saponificação. A saponificação foi realizada simultânea a extração utilizando uma solução etanólica de 10% KOH (p/v) na proporção de 1:1 em relação ao extrato. Os extratos foram filtrados e transferidos para éter de petróleo em funil de separação. A retirada completa do álcali e do solvente foi realizada através de sucessivas lavagens com água destilada. Os extratos saponificados e não saponificados foram concentrados em

evaporador rotatório à temperatura máxima de 35 °C e secos em fluxo suave de nitrogênio.

### **2.3 Determinação da atividade antioxidante**

O poder antioxidante das oleoresinas foi analisado com base em dois métodos de determinação da atividade antioxidante, os quais foram realizados em triplicata. Para tanto, empregou-se o método baseado no seqüestro de radicais DPPH e na co-oxidação de uma emulsão de  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico.

Para o teste do seqüestro do radical DPPH seguiu-se a metodologia descrita por Bertoldi [6]. A 1 mL de extrato foram adicionados 3 mL de solução de DPPH 0,1 mM. O branco foi preparado substituindo 1 mL de extrato por 1 mL de etanol absoluto. A absorbância do branco foi determinada imediatamente após a mistura e a absorbância da amostra foi lida no tempo zero e a cada 15 min durante 6 horas. As leituras espectrofotométricas foram feitas em 517 nm. A concentração de DPPH remanescente no meio de reação foi calculada segundo a curva de calibração de DPPHr empregando-se 6 diluições de cada extrato (1:10; 0,5:10; 0,25:10; 0,12:10; 0,06:10). A atividade antioxidante foi expressa pelo EC<sub>50</sub>, quantidade de amostra necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, determinado a partir da curva de DPPHr no estado estacionário em função das diluições dos extratos. Como termo de comparação, foi utilizada a atividade antioxidante do trolox, determinada nas mesmas condições.

A avaliação da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoléico foi determinada segundo a metodologia descrita por AMIN et al. [2]. Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 20  $\mu$ L de ácido linoléico, 200  $\mu$ L de Tween 40 e 2 mL da solução de  $\beta$ -caroteno (0,2 mg.mL<sup>-1</sup> clorofórmio). A mistura foi evaporada a 40 °C por 10 minutos empregando evaporador rotatório. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com a adição de aproximadamente 100 mL de água destilada e oxigenada sob vigorosa agitação. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,2 mL dos

extratos com diferentes diluições. O branco foi preparado com 0,2 mL de cada diluição dos extratos e 5 mL da emulsão sem o  $\beta$ -caroteno. O sistema foi mantido a 50 °C. Medidas espectrofotométricas de absorvância foram monitoradas em espectrofotômetro, a 470 nm, imediatamente após a mistura e a cada 15 minutos, durante 120 minutos. A atividade antioxidante, expressa como percentual de inibição da oxidação, foi calculada em relação a 100% da oxidação do controle. Como termo de comparação, foi utilizada a atividade antioxidante do BHT, determinada nas mesmas condições.

Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância e Teste de Duncan para diferença entre médias ao nível de 95% de confiabilidade, com auxílio do Software SANEST.

#### **2.4 Confirmação da identidade dos carotenóides e quantificação do teor de luteína**

A identificação do carotenóide majoritário nas amostras foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por NUNES & MERCADANTE [17], empregando-se o cromatógrafo líquido Shimadzu CLASS-VP.

A confirmação da presença da luteína baseou-se na avaliação conjunta do perfil em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio do tempo de retenção e co-cromatografia com padrão autêntico de luteína, e espectro de absorção no visível obtido em espectrofotômetro HITACHI U-2001.

Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YMC (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm), utilizando metanol (0,1% de trietilamina)/metil-tert-butil éter 95:5 como fase móvel, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> em modo isocrático, injeção de 30  $\mu$ L, sendo os cromatogramas obtidos a 450 nm.

Os solventes utilizados, todos grau cromatográfico, foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo com membrana de 0,45  $\mu$ m, apropriada para solvente orgânico e, a seguir, degaseificados em ultra-som. As amostras foram ressuspendidas em 2 mL de metil-tert-butil éter e filtradas em membrana de polietileno de 0,22  $\mu$ m de poro.

A quantificação do teor de luteína nas amostras foi efetuada por CLAE empregando padrão externo. A curva de calibração foi construída com seis pontos e a faixa de concentração utilizada foi de 0,002 a 0,2 g.L<sup>-1</sup>.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações no solvente extrator, bem como as modificações na etapa de saponificação, provocaram variações significativas na capacidade antioxidante dos extratos.

Ao medir-se o poder antioxidante dos extratos pelo método de seqüestro do radical DPPH verificou-se que as alterações decorrentes dos solventes extratores foram observadas apenas nos extratos saponificados (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Valor de EC<sub>50</sub> nos extratos de tagetes não saponificados e saponificados

Solvente	EC <sub>50</sub> (g.mmol radical DPPH <sup>-1</sup> )	
	Sem saponificação	Com saponificação
Etanol a frio	0,044 Aa	0,129 Ba
Tetraidrofurano a frio	0,164 Aa	0,068 Ba
Hexano a frio	0,086 Ab	1,547 Aa
Hexano a quente	0,114 Aa	0,336 Ba

\*Letras maiúsculas diferentes na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas diferentes na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Duncan (p≤ 0,05).

Os extratos de tagetes que apresentaram maior capacidade de seqüestro do radical DPPH foram os extraídos com etanol sem saponificação (0,044 g.mmol radical DPPH<sup>-1</sup>) e o saponificado extraído com tetraidrofurano (0,068 g.mmol radical DPPH<sup>-1</sup>), ambos a frio. Justificado pelo fato de que foi necessário um menor teor de extrato para reduzir a mesma concentração de radicais DPPH, ou seja, 50%. A capacidade de seqüestro do radical DPPH por estes dois extratos foi superior à apresentada pelo padrão de Trolox (**0,071** g.mmol radical DPPH<sup>-1</sup>). O Trolox, análogo a

vitamina E, caracteriza-se como antioxidante primário, atuando no bloqueio da ação de radicais livres por meio da doação do radical hidrogênio [6].

Tabela 2 – Valor de EC<sub>50</sub> nos extratos de calêndula não saponificados e saponificados

Solvente	EC <sub>50</sub> (g.mmol radical DPPH <sup>-1</sup> )	
	Sem saponificação	Com saponificação
Etanol a frio	0,041 Aa	0,042 Ba
Tetraidrofurano a frio	0,004 Aa	0,015 Ba
Hexano a frio	0,041 Ab	0,851 Aa
Hexano a quente	0,034 Aa	0,072 Ba

\*Letras maiúsculas diferentes na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas diferentes na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Duncan (p≤ 0,05).

Nos extratos de calêndula a melhor atividade antioxidante foi verificada para as oleoresinas extraídas com tetraidrofurano independente da saponificação (0,004 e 0,015 g.mmol radical DPPH<sup>-1</sup>), sendo que ambas apresentaram melhor efeito protetor que o padrão Trolox (**0,071** g.mmol radical DPPH<sup>-1</sup>). Da mesma forma que para o tagetes, diferenças significativas quanto ao efeito do solvente extrator foram verificadas apenas nas amostras saponificadas (p≤ 0,05).

Pode-se notar ao avaliar as Tabelas 1 e 2 que, apesar das diferenças numéricas entre os extratos saponificados e não saponificados, que indicam que a saponificação reduziu o poder antioxidante dos extratos, o único extrato que apresentou diferença significativa quanto a etapa de saponificação foi o extraído com hexano a frio (p≤ 0,05), comportamento este verificado nas duas flores avaliadas.

Ao avaliar a Figura 1, fica evidente o princípio que rege o ensaio do radical DPPH. Este ensaio baseia-se na perda de coloração e conseqüente queda de absorbância apresentada pelo radical livre DPPH ao ser reduzido por compostos doadores de hidrogênio ou elétrons, retardando o processo oxidativo [6].

Quando a porcentagem de radicais DPPH existentes no meio reacional que ainda não reagiram com os compostos antioxidantes do

extrato ao longo do tempo atinge o estado estacionário, a reação entre os antioxidantes e os radicais DPPH cessa. Assim, é possível calcular a quantidade real de radicais DPPH que foram reduzidos pela amostra em estudo, evitando a seleção de um intervalo de tempo inadequado em que a reação ainda ocorre. Considerando que após um determinado intervalo de reação a redução dos radicais livres DPPH pelos compostos antioxidantes presentes nas oleoresinas ocorreu muito lentamente e de forma muito discreta, o intervalo de 270 minutos de reação foi empregado para o cálculo do EC<sub>50</sub>.

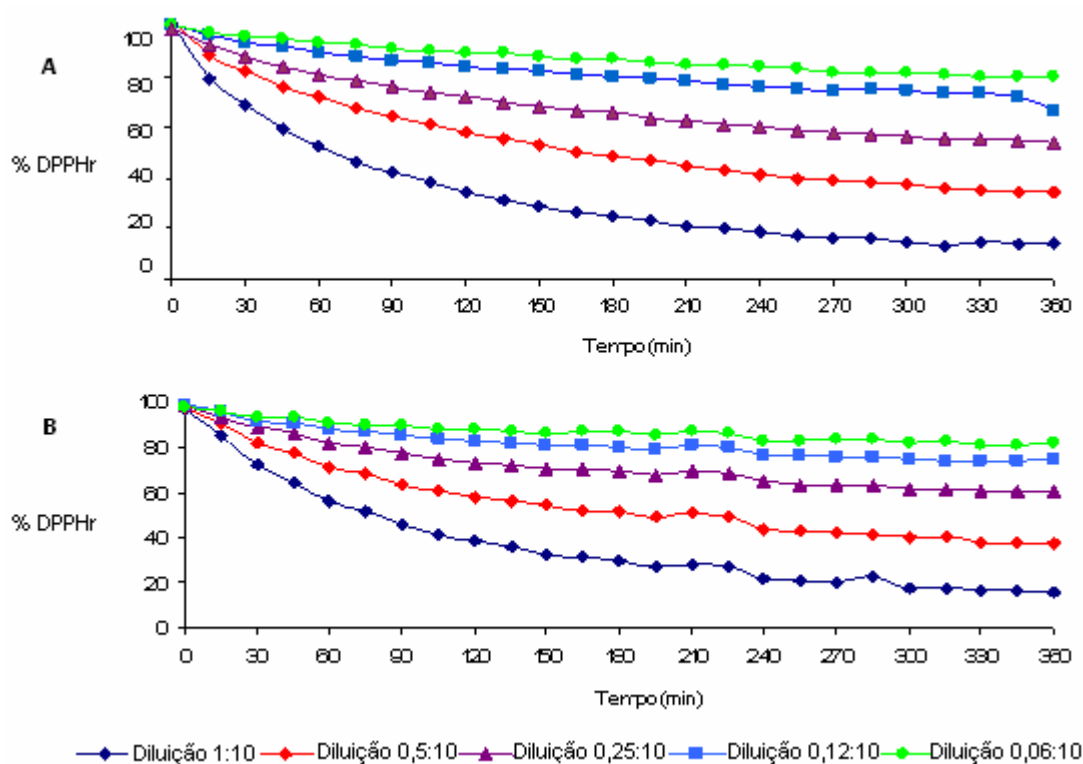


Figura 1 - Desempenho dos extratos saponificados de tagetes (A) e calêndula (B) extraídos com tetraidrofurano, pelo teste do radical DPPH.

Avaliando o comportamento dos extratos saponificados de tagetes e calêndula extraídos com tetraidrofurano apresentado na Figura 1, percebe-se que os extratos apresentaram comportamento semelhante e uma proporcionalidade entre diluição e consumo do radical DPPH no meio reacional.

Ao avaliar o declínio na concentração de radicais livres DPPH remanescente nos extratos apresentados na Figura 1, nota-se que a evolução da cinética de reação seguiu o comportamento lento e que esses extratos são constituídos por diferentes compostos, visto que a reação entre os radicais DPPH e a oleoresina diluída não cessou por completo em 6 horas, mas ocorreu lentamente.

Quando a capacidade antioxidante dos extratos de tagetes foi avaliada pelo sistema acoplado do  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico verificou-se que ao contrário dos dados de  $EC_{50}$  os solventes afetaram os extratos independente da etapa de saponificação (Tabelas 3 e 4). A melhor proteção a oxidação foi apresentada pelas oleoresinas obtidas com tetraidrofurano a frio, tanto para oleoresina não saponificada como para a saponificada de tagetes (72,22% e 52,81%) e calêndula (72,97% e 57,06%).

Tabela 3 – Porcentagem de Inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico dos extratos de tagetes não saponificados e saponificados

Solvente	% de inibição da oxidação	
	Sem saponificação	Com saponificação
Etanol a frio	66,63 Aa	15,67 Bb
Tetraidrofurano a frio	72,22 Aa	52,81 Aa
Hexano a frio	63,89 Aa	25,11 Bb
Hexano a quente	21,25 Ba	39,51 Aba

\*Letras maiúsculas diferentes na coluna evidenciam diferença significativa para o fator solvente dentro de saponificação. Letras minúsculas diferentes na linha evidenciam diferenças do fator saponificação dentro de cada solvente, pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Pela Tabela 3 constata-se que os extratos de tagetes não saponificados extraídos com etanol, tetraidrofurano e hexano, todos a frio, não diferiram entre si de modo significativo, em relação a proteção contra a oxidação lipídica (66,63 %, 72,22% e 63,89%, respectivamente). No entanto, apresentaram proteção superior ao extrato hexânico obtido mediante aquecimento (21,25%). Porém, quando estes foram submetidos a saponificação o extrato que demonstrou melhor atividade antioxidante foi o extraído com tetraidrofurano (52,81%) cuja atividade foi similar a

apresentada pelo extrato obtido com hexano a quente (39,51%), sendo que este último, por sua vez, apresentou poder protetor similar ao extratos etanólico (15,67%) e ao obtido com hexano a frio (25,11%).

Ainda a respeito da Tabela 3, observa-se que os extratos etanólicos e hexânicos, ambos empregados a frio, foram os únicos a apresentarem diferenças estatísticas quanto ao efeito da etapa de saponificação. Estes apresentaram maior proteção na ausência da saponificação, com porcentagem de inibição da oxidação de 66,63% e 63,89%, respectivamente.

Tabela 4 – Porcentagem de Inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico dos extratos não saponificados e saponificados de calêndula

Solvente	% de inibição da oxidação	
	Sem saponificação	Com saponificação
Etanol a frio	31,42 Ba	32,03 Ba
Tetraidrofurano a frio	72,97 Aa	57,06 Aa
Hexano a frio	25,48 Ba	21,29 Ba
Hexano a quente	31,22 Ba	24,87 Ba

Pela Tabela 4 pode-se verificar que tanto os extratos de calêndula não saponificados como os saponificados obtidos com o solvente tetraidrofurano (72,97% e 57,06%, respectivamente), apresentaram maior capacidade de inibir a oxidação em relação aos extratos oriundos dos demais solventes, os quais não diferiram entre si.

Ainda avaliando a Tabela 4, observou-se que a saponificação não afetou significativamente a capacidade protetora dos diferentes extratos de calêndula, contrariando o comportamento observado nos extratos das flores de tagetes extraídas com etanol e hexano a frio (Tabela 3).

Ao avaliar a Figura 2 fica evidente o poder antioxidante dos extratos de luteína obtidos de tagetes e calêndula ao auxiliarem no retardo da oxidação do  $\beta$ -caroteno. Uma vez que, o ensaio do sistema emulsionado  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico fundamenta-se na descoloração do  $\beta$ -caroteno

induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes contribui para retardar a queda da absorvância do  $\beta$ -caroteno [6].

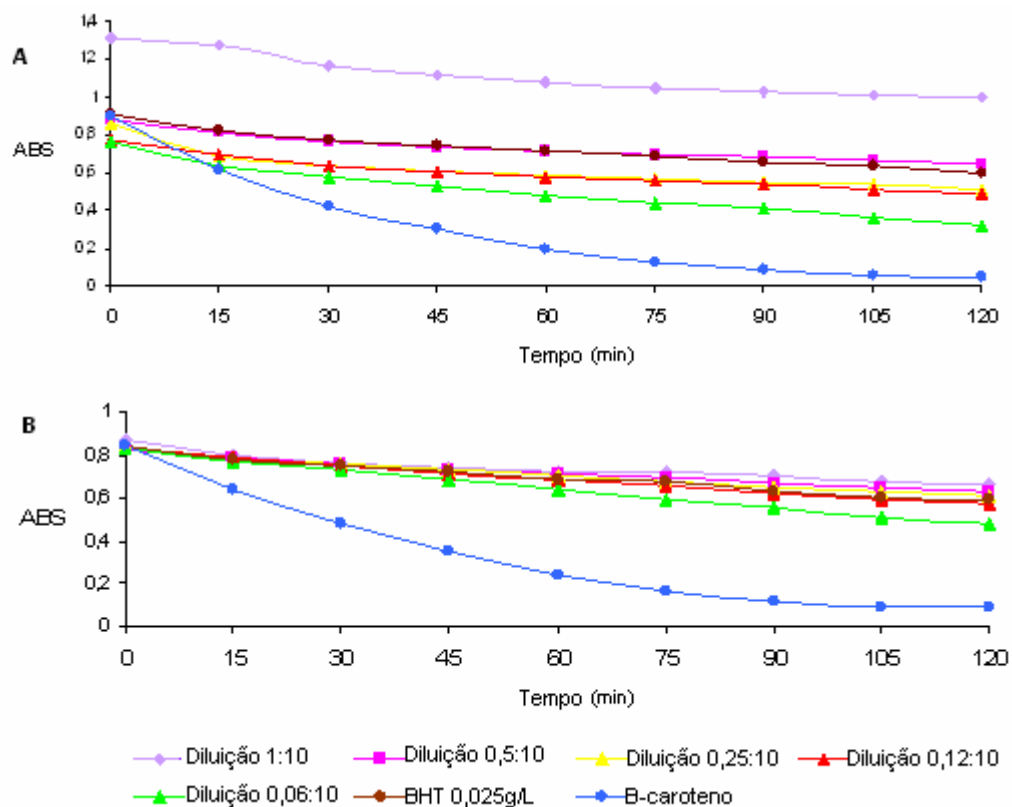


Figura 2 – Desempenho dos extratos de tagetes (A) e de calêndula (B) não saponificados extraídos com tetraidrofurano, pelo teste do sistema emulsionado  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico.

Nota-se pela Figura 2, que o efeito da diluição não teve grande influência no extrato de calêndula ao contrário do que é observado no extrato de tagetes, onde se observa uma relação inversa entre diluição e capacidade protetora.

Bertoldi [6] trabalhando com pimenta rosa e empregando o ensaio do radical DPPH, verificou que a redução da absorvância ao longo do tempo era bem definida para cada diluição e que a medida que se diluía a amostra observava-se uma redução proporcional em sua absorvância em virtude de uma menor quantidade de antioxidantes presentes na amostra. No entanto, este comportamento não era observado ao empregar o sistema emulsionado

$\beta$ -caroteno/ác. linoléico, onde as curvas de queda de absorvância apresentavam-se bem próximas com ausência de uma boa distinção da relação entre atividade antioxidante e concentração de antioxidantes. Pelo comportamento apresentado na Figura 2 fica evidente que além do método de determinação da atividade antioxidante, as características do extrato, ou seja, quantidade e tipo de compostos presentes, também, influenciam o comportamento deste frente aos ensaios empregados.

A saponificação de uma forma geral contribuiu para a redução da capacidade protetora dos extratos quanto à oxidação, por ambos os testes empregados. No entanto, diferenças estatísticas foram verificadas apenas nos extratos de tagetes e calêndula obtidos com hexano a frio em relação ao método do DPPH (Tabelas 1 e 2) e nos extratos de tagetes extraídos com etanol e hexano, ambos a frio, ao empregar o sistema acoplado do  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico (Tabela 3).

O efeito da saponificação na redução da capacidade antioxidante dos extratos fica confirmado ao observar a Figura 3.

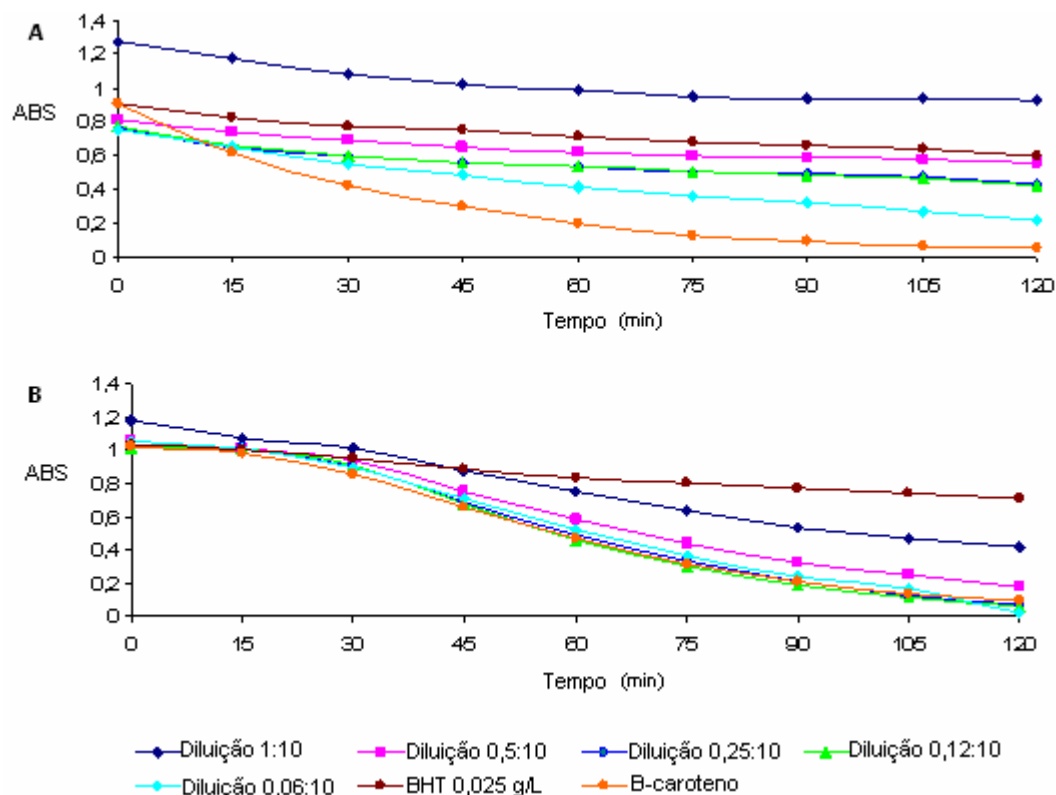


Figura 3 - Desempenho do extrato hexânico de tagetes não saponificado (A) e saponificado (B), pelo teste do sistema emulsionado  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico.

Ao avaliar a Figura 3, nota-se que os extratos não saponificados apresentaram melhor capacidade em proteger o  $\beta$ -caroteno comparado aos saponificados com o mesmo solvente extrator. Nos extratos saponificados observa-se um brusco declínio a partir dos 15 minutos iniciais de reação, no entanto nos extratos sem saponificação a queda na absorvância ocorre mais lentamente, o que se assemelha ao comportamento do padrão BHT na concentração de  $0,025\text{g.L}^{-1}$ .

Guerra, Melo & Mancini [13] ao trabalharem com cinco diferentes frações de carotenóides ( $\beta$ -caroteno, epóxido de  $\beta$ -criptoxantina, luteína-5,6-epóxido, violaxantina e neoxantina) provenientes do extrato etéreo de coentro, não verificaram diferenças significantes com relação as características antioxidantes destes componentes ao empregar o modelo da emulsão de  $\beta$ -caroteno/ác. linoléico. No entanto, a proteção conferida por estes carotenóides foi inferior a apresentada pelo padrão BHT, porém, mesmo assim, tanto o extrato como suas frações apresentaram potencial como inibidores da oxidação, uma vez que estas substâncias podem ser ingeridas sem limitações. O  $\beta$ -caroteno representava 61,14% dos carotenóides do extrato o que levou os autores a afirmarem que este era o componente principal na ação antioxidante do mesmo. Além disso, os autores verificaram um sinergismo entre os carotenóides, uma vez que a proteção do extrato era superior a apresentada pelas frações individuais.

No presente trabalho o aquecimento não demonstrou um comportamento definido quanto ao seu efeito na capacidade antioxidante dos extratos (Tabelas 1, 2, 3 e 4), o que pode ser justificado pela extração de outros compostos além da luteína e degradação de parte dos carotenóides presente nos mesmos, uma vez que o esperado seria que temperaturas de extração acima de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  reduzissem a atividade antioxidante dos extratos, pela degradação de compostos, principalmente, de carotenóides que são termolábeis.

Já Bertoldi [6] verificou um aumento na atividade antioxidante de oleoresinas de pimenta rosa extraídas a quente, justificado pelo favorecimento da temperatura na extração de outros compostos com atividade antioxidante, além dos fenólicos já observados nos extratos.

Uma vez constatada a ação antioxidante dos extratos brutos, passou-se à quantificação do teor de luteína neles presentes. Estes valores podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Teor médio de luteína (mg.100g flor seca<sup>-1</sup>) e porcentagem (%) de luteína do total de carotenóides nos extratos de tagetes e calêndula

Tratamento	Tagetes		Calêndula	
	Teor *	% **	Teor *	% **
<b>Sem saponificação</b>				
Etanol a frio	28,4	63,7	11,2	20,2
Tetraidrofurano a frio	22,2	58,9	13,5	21,2
Hexano a frio	15,2	49,7	7,1	26,0
Hexano a quente	6,9	44,5	13,0	22,7
<b>Saponificado</b>				
Etanol a frio	266,5	74,1	4,2	24,6
Tetraidrofurano a frio	1220,0	77,5	30,1	18,7
Hexano a frio	893,9	81,4	31,2	21,7
Hexano a quente	415,5	65,4	10,3	20,0

\* Teor de luteína nos extratos expresso em mg.100g de flor seca<sup>-1</sup>.

\*\* Porcentagem de luteína em relação ao total de carotenóides.

De acordo com os resultados da Tabela 5, foi detectado menor teor de luteína nos extratos não saponificados, não obstante exibirem ação antioxidante similar ou superior a apresentada pelos extratos saponificados (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Diante destes dados, e considerando que, além da luteína, as flores estudadas contêm outros inibidores de oxidação como ácido ascórbico, ácidos hidroxicarboxílicos e demais carotenóides [29], pode-se afirmar que estes compostos contribuíram para a ação antioxidante dos extratos, uma vez que aqueles com maior concentração de luteína não apresentaram necessariamente a maior proteção quanto a oxidação.

As diferenças de valores encontradas no presente trabalho ao comparar os dois métodos de determinação da atividade antioxidante baseia-se nos diferentes princípios que os regem. Nos últimos anos, devido as propriedades fisiológicas relatadas para os antioxidantes naturais, tais

como, atividade antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, antimutagênica, antialérgica, antienvhecimento e outras, vários estudos tem analisado o potencial antioxidante de uma grande variedade de vegetais. Como consequência, também apareceram vários ensaios para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* em diferentes tipos de amostras biológicas, particularmente em matrizes complexas como vinhos e vegetais. Estes ensaios envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a quelação de íons metálicos até a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas. Devido a estas diferenças, recomenda-se o emprego de pelo menos dois métodos para avaliar a atividade antioxidante da amostra estudada [12].

Segundo Miura et al. [16], vários são os métodos para testar a atividade antioxidante de uma amostra, podendo ser usados para compostos isolados ou extratos. Estes métodos podem ser testados *in vitro* e *in vivo*. Afirmam ainda, que não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois existem vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer [18], entre eles seqüestro de radicais, habilidade redutora, complexação de íons metálicos, etc. Também há uma dificuldade de comparar estes métodos, devido à complexidade e princípios diferentes de reações. Alguns métodos antioxidante produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se algumas vezes impossível qualquer comparação entre eles [4, 5].

De acordo com Bertoldi [6], o DPPH é um radical muito estável, de difícil degradação, apresentando absorvância sem alteração por um período de até 6 horas. Entretanto, a degradação do  $\beta$ -caroteno ocorre rapidamente e de forma descontrolada, já que não é possível controlar o nível de oxigenação, a interação do oxigênio com o  $\beta$ -caroteno e a quantidade e o tipo de produtos de degradação derivados da oxidação do ácido linoléico.

Wettasinghe & Shahidi [32] afirmam que a ação antioxidante de um composto difere marcadamente em função das propriedades físicas e químicas do sistema modelo empregado. Este fenômeno é decorrente da afinidade do composto pela interfase óleo-ar e óleo-água do sistema lipídico e da emulsão, respectivamente, cujas propriedades são influenciadas pela natureza química do composto antioxidante envolvido [29].

## 4 CONCLUSÃO

O solvente extrator apresentou efeito significativo na capacidade antioxidante dos extratos de *Tagetes patula* L. e *Calendula officinalis* L. De modo geral, o melhor solvente foi o tetraidrofurano.

A saponificação foi associada a uma redução na capacidade protetora dos extratos com relação a oxidação, uma vez que esta capacidade estava correlacionada não só a presença de luteína, mas também, com a ação de outros compostos com capacidade antioxidante.

As duas fontes vegetais podem ser consideradas como fontes promissoras de luteína e outros compostos bioativos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicol. Lett.**, v. 150, p. 57-83, 2004.
2. AMIN, I; RORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chem.**, n.94, p. 47-52, 2006.
3. ALONSO, A. M., et al. Determination of antioxidant activity of wine by products and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.**, n.50, p. 5832-5836, 2002 a.
4. ALONSO, A. M., et al. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.**, n.50, p. 3112-3115, 2002 b.
5. ALONSO, A. M. et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Res. Int.**, n. 37, p. 715-721, 2004.
6. BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

7. BROW, L. et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract in US men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 517-524, 1999.
8. CHASAN-TABER, L. et al. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 509-516, 1999.
9. DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T.M. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optom.**, v. 71, p. 147-164, 2000.
10. EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.
11. FONTANA, J.D. et al. **Carotenóides cores atraentes e ação biológica.** Disponível em: <http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>. Acesso em: 23 jun. 2004.
12. GIADA, M. de L.R.; MANCINI-FILHO, J. Determinação da atividade antioxidante de semente de girassol (*helianthus annuus* L.) através de três diferentes métodos *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD-Rom.
13. GUERRA, N.B.; MELO, E. de A.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) etheric extract. **J. Food Comp. Anal.**, v. 18, p. 193-199, 2005.
14. LICOPENO, Luteína e zeaxantina: mais do que potentes antioxidantes. **Adit. Ingrid.**, v. 24, p.48-61, 2003.
15. MELLO, M.C. de. **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenóides.** 2002, 113 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
16. MIURA, K.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. **J. Food Chem.**, n. 50, p. 1845-1851, 2002.
17. NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z: utilização de colunas de fase reversa C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> para separação de carotenóides por CLAE. In: CONGRESSO

- BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD-Rom.
18. OU, B., et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.**, n. (--), p. (--), 2002.
19. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods.** Washington: ILSI - International Life Sciences Institute, 2001. 64 p.
20. SÁ, M.C. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.**, v. 83, p. 595-600, 2003.
21. SATO, M. et al. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **J. Agric. Food Chem.**, n. 44, p. 37-41, 1996.
22. SHAIDI, F. Natural antioxidants. An overview. In: SHAIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications.** Newfoundland: AOCS Press, 1997. cap. 1, p. 1-11.
23. SCHALCH, W. **A Importância dos carotenóides.** Disponível em: [http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista\\_artigo.php?cod=345](http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista_artigo.php?cod=345). Acesso em: 01 jun. 2004.
24. SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun. 2004.
25. SILVA, P.C.F. da. **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uvas branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados.** 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
26. SOUTHON, S.; FAULKES, R. Carotenoids in food: bioavailability and functional benefits. In: \_\_\_\_\_. **Phytochemical functional foods.** Chicago: Woodhead CRC Press LLC, 2003. cap. 7.
27. SUMANTRAN, V.N. et al. Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. **Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.**, v. 9, p. 257-263, 2000.

28. PRISFAR. **Casos de sucesso:** Luteína purificada pela primeira vez nas farmácias portuguesas, pelas mãos da Prisfar. Disponível em: <http://www.calendulafarma.com.br/luteina.htm>. Acesso em: 01 jun. 2004.
29. POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 2, n. 9, p. 223-227, 1991.
30. POLYAKOV, N.E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biol. Med.**, v. 31, n. 3, p. 398-404, 2001.
31. WANG, M. et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p.1522–1529, 2006.
32. WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em termos de quantificação a saponificação só é necessária se a fonte em estudo contiver um alto teor de ésteres, interferentes e demais compostos saponificáveis. Quando efetuada simultânea a extração a saponificação possibilita reduzir em ao menos 12 h o tempo de obtenção do produto, o que vem a reduzir também as deteriorações oxidativas sofridas pelos carotenóides nesta etapa.

A saponificação apresentou um efeito significativo na atividade antioxidante da luteína extraída de flores de *T. patula* L. e *C. officinalis* L. Ao realizá-la obteve-se um produto com menor atividade biológica e maior teor de luteína. Desta forma, para aplicação em formulações de alimentos, com alegações de propriedades funcionais, deve-se dar prioridade ao emprego de extratos e não das frações isoladas de carotenóides.

Como se pôde notar no trabalho, a escolha do solvente extrator tem um papel fundamental na análise e extração de carotenóides em alimentos, tanto quando se refere às questões quantitativas como qualitativas. A polaridade dos solventes influenciou o perfil de carotenóides extraídos. Os solventes apresentaram comportamento diferenciado com relação a capacidade extratora e a atividade antioxidante dos extratos de acordo com a espécie empregada como fonte de luteína.

As flores de *T. patula* L. e *C. officinalis* L. podem ser consideradas fontes promissoras de compostos bioativos, apesar das flores de *C. officinalis* terem apresentado reduzido teor de luteína. As flores de *T. patula* L. podem ser empregadas na extração comercial de luteína, juntamente com as flores de *T. erecta* L., com possibilidade de melhorias.