



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES E ANTOCIANINAS DE FRUTAS

Adelia Ferreira de Faria Machado

Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. **Adriana Zerlotti Mercadante**

Orientadora

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

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F225i Faria-Machado, Adelia Ferreira de
Identificação e determinação da atividade antioxidante de
carotenóides e antocianinas de frutas / Adelia Ferreira de Faria-
Machado. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Pigmentos. 2. Carotenóides. 3. Antocianinas. 4. HPLC. 5.
Atividade antioxidante. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Identification and antioxidant activity determination of carotenoids and
anthocyanins from fruits

Palavras-chave em inglês (Keywords): Pigments, Carotenoids, Anthocyanins, HPLC, Antioxidant
activity

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante

Adriana Vitorino Rossi

Lílian Regina Barros Mariutti

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Renato Atilio Jorge

Data de defesa: 10/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Adelia Ferreira de Faria Machado, aprovado pela comissão julgadora em 10 de março de 2010.

Prof.^a Dr.^a Adriana Zerlotti Mercadante (Orientador)
DCA / FEA / UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Adriana Vitorino Rossi
DQA / IQ / UNICAMP

Dr.^a Lilian Regina Barros Mariutti
LANAGRO / MAPA

Dr.^a Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
FBA / FCF / USP

Prof. Dr. Renato Atílio Jorge
DFQ / IQ / UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Beatriz Rosana Cordenunsi
FBA / FCF / USP

Prof.^a Dr.^a Florinda Orsatti Bobbio
DCA / FEA / UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Inar Alves de Castro
FBA / FCF / USP

Dedico este trabalho ao meu marido Carlos Eduardo, meu grande incentivador, aos meus pais Luiz Sergio e Maria Adelia, e aos meus irmãos Marcele, Marlize e João Thomaz.

Pelo amor e a paciência que me dedicam e pelos exemplos de persistência, competência e responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, a saúde e a proteção renovadas a cada dia.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Adriana Zerlloti Mercadante, pelos valiosos ensinamentos e contribuições, a paciência e o tempo dedicado à execução deste trabalho.

A banca examinadora, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicadas ao aperfeiçoamento deste trabalho.

A minha família, incluindo meus padrinhos Wenceslau e Alda Maria, meus sogros Edevar e Herminia, meus cunhados e cunhadas e meus sobrinhos, pelo amor, o incentivo e a paciência em todos os momentos.

A todos que fazem (ou fizeram) parte do Laboratório de Química de Alimentos, especialmente a Marcella, Prof.^a Dr.^a Florinda Bobbio e Prof.^a Dr.^a Neura Bragagnolo, pelo auxílio e sugestões, importantes para a execução deste trabalho, e pelos momentos de descontração e agradáveis conversas.

Ao Prof. Dr. Claudio D. Borsarelli, pelos ensinamentos, as contribuições, a paciência e o apoio nos trabalhos em parceria.

Ao Prof. Dr. Renato Atílio Jorge pelas dicas, sugestões e apoio prestado no decorrer deste trabalho.

A todos que de certa forma participaram do meu esforço e me apoiaram para a conclusão deste trabalho.

Por fim, a CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxii
LISTA DE SÍMBOLOS	xxv
RESUMO GERAL	xxvii
SUMMARY	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS.....	7

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Propriedades físico-químicas de carotenoides e antocianinas.....	11
1.1. Carotenoides.....	11
1.2. Antocianinas.....	13
2. Composição de carotenoides e antocianinas em frutas	17
3. Atividade antioxidante	20
3.1. Oxigênio singlete e radicais livres	20
3.2. Lipossomas	25
4. Microencapsulação de pigmentos	30
5. Referências Bibliográficas	33

CAPÍTULO II

CULTIVAR INFLUENCE ON CAROTENOID COMPOSITION OF LOQUATS FROM BRAZIL

ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
MATERIAL and METHODS.....	49
Material	49
Samples	50
Carotenoid Extraction.....	51
HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS/MS Analysis	51
Statistical Analysis	54
RESULTS and DISCUSSION.....	54
Carotenoid Identification	54
Quantitative Composition	61
Provitamin A Activity	65
REFERENCES.....	66

CAPÍTULO III

CAROTENOID COMPOSITION OF JACKFRUIT (*Artocarpus heterophyllus*), DETERMINED BY HPLC-DAD-MS/MS

ABSTRACT	75
Introduction.....	76
Materials and Methods	77
<i>Standards</i>	77
<i>Samples</i>	77
<i>Carotenoid Extraction</i>	78
<i>HPLC-DAD-MS/MS Analysis</i>	78
<i>Statistical Analysis</i>	79

Results and Discussion	80
<i>Carotenoid Identification</i>	80
<i>Quantitative Composition</i>	87
References	90

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*)

RESUMO.....	97
1. Introdução	98
2. Material e Métodos.....	100
2.1. Material	100
2.2. Equipamentos	101
2.3. Extratos	102
2.3.1. Compostos fenólicos.....	102
2.3.2. Carotenoides	103
2.3.3. Ácido Ascórbico	103
2.4. Análise quantitativa de compostos fenólicos.....	104
2.4.1. Compostos fenólicos totais	104
2.4.2. Flavonoides	104
2.4.3. Antocianinas monoméricas	104
2.4.4. Taninos	105
2.5. Análises por HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS/MS	105
2.5.1. Compostos fenólicos.....	105
2.5.2. Carotenoides	106
2.5.3. Ácido Ascórbico	107
2.6. Determinação da atividade antirradical ABTS ^{•+}	108
2.7. Determinação da atividade frente ao oxigênio singlete (¹ O ₂)	108

3. Resultados e Discussão.....	109
3.1. Compostos bioativos.....	109
3.2. Perfil de compostos fenólicos.....	113
3.3. Composição de carotenoides.....	124
3.4. Atividade antirradical ABTS ^{•+} e frente ao ¹ O ₂	130
4. Referências Bibliográficas.....	135

CAPÍTULO V

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ANTOCIANINA CIANIDINA 3-GLUCOSÍDEO EM SISTEMA MIMETIZADOR DE MEMBRANAS

RESUMO.....	145
1. Introdução.....	146
2. Material e Métodos.....	148
2.1. Material.....	148
2.2. Preparo dos lipossomas.....	148
2.3. Monitoramento da oxidação lipídica.....	150
3. Resultados e Discussão.....	151
4. Conclusão.....	162
5. Referências Bibliográficas.....	162

CAPÍTULO VI**CHARACTERIZATION AND SINGLET OXYGEN QUENCHING ABILITY OF GUM ARABIC AND MALTODEXTRIN SPRAY-DRIED MICROCAPSULES CONTAINING ANTIOXIDANT MOLECULES**

ABSTRACT	169
Introduction.....	170
Materials and Methods	172
Materials	172
Preparation of microcapsules.....	173
Microencapsulation efficiency (ME).....	173
Microcapsule properties	174
Quenching of singlet oxygen	176
Results and Discussion	176
Microcapsule properties	176
Quenching of singlet oxygen	183
References	190
CONCLUSÃO GERAL.....	193

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1. Composição de carotenoides e/ou antocianinas de algumas frutas das famílias MORACEAE, MYRTACEAE e ROSACEAE.....	20
--	----

CAPÍTULO II

CULTIVAR INFLUENCE ON CAROTENOID COMPOSITION OF LOQUATS FROM BRAZIL

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from loquat cultivars, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.....	57
Table 2 Concentration ($\mu\text{g}/100\text{g}$) of carotenoids and vitamin A values (μg RAE/100 g) of loquat cultivars.	63

CAPÍTULO III

CAROTENOID COMPOSITION OF JACKFRUIT (*Artocarpus heterophyllus*), DETERMINED BY HPLC-DAD-MS/MS

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from jackfruit, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.	81
Table 2 Concentration ($\mu\text{g}/100$ g fresh weight) of carotenoids in different batches of jackfruit and their vitamin A values (μg RAE/100 g fresh weight).	88

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*)

Tabela 1. Teores de compostos bioativos de jambolão.....	110
Tabela 2. Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição das antocianinas de jambolão.	114
Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas de compostos fenólicos não antociânicos de jambolão, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS.....	119
Tabela 4. Características cromatográficas e espectroscópicas, e teores de carotenoides de jambolão, obtidos por HPLC-DAD-MS/MS.....	125
Tabela 5. Valores de TEAC, porcentagem de proteção frente ao 1O_2 e absorvância a 520 nm do extrato funcional nas diferentes condições de pH.....	131

CAPÍTULO V

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ANTOCIANINA CIANIDINA 3-GLUCOSÍDEO EM SISTEMA MIMETIZADOR DE MEMBRANAS

Tabela 1. Condições de pH e concentrações de cianidina 3-glucosídeo utilizados no preparo dos lipossomas.....	149
--	-----

CAPÍTULO VI**CHARACTERIZATION AND SINGLET OXYGEN QUENCHING ABILITY OF GUM ARABIC AND MALTODEXTRIN SPRAY-DRIED MICROCAPSULES CONTAINING ANTIOXIDANT MOLECULES**

- Table 1.** Microcapsule composition, core molecule concentration, microencapsulation efficiency (ME) and mean diameter of the spray-dried microcapsules prepared with gum arabic (GA) and maltodextrin 20DE (MD). 177
- Table 2.** Average Py fluorescence anisotropy (r) and quenching by molecular oxygen in water and microcapsule solutions prepared with gum arabic (GA) and maltodextrin 20DE (MD). 182
- Table 3.** Rate constant values for the total quenching of $^1\text{O}_2$ by antioxidant quenchers (AOx) in acetonitrile and by GA and MD-microcapsules in D_2O solution..... 185

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estruturas moleculares de carotenoides.	12
Figura 2. Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos. As colunas C3' e C5' correspondem aos grupos funcionais ligados aos carbonos 3' e 5', respectivamente.	14
Figura 3. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa ácida. Adaptado de Mercadante & Bobbio (2008).	16
Figura 4. Estrutura molecular do cátion radical ABTS ^{•+}	22
Figura 5. Estruturas da membrana bimolecular de lipossomas (A) e de micelas (B1 e B2).	26

CAPÍTULO II

CULTIVAR INFLUENCE ON CAROTENOID COMPOSITION OF LOQUATS FROM BRAZIL

Figure 1 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from Néctar de Cristal cultivar. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm.	54
Figure 2 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from Mizauto cultivar. Chromatographic conditions: see text.	55
Figure 3 Structures of some carotenoids detected in loquat.	55

CAPÍTULO III

CAROTENOID COMPOSITION OF JACKFRUIT (*Artocarpus heterophyllus*), DETERMINED BY HPLC-DAD-MS/MS

- Figure 1** Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoids from jackfruit batch B. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm..... 80
- Figure 2** Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoids from jackfruit batch C. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm..... 83
- Figure 3** UV-Vis spectra, obtained by HPLC-DAD, of all-*trans*- α -carotene (bold solid line), 9-*cis*- β -carotene (dot line), 13-*cis*- β -carotene (dash line) and 15-*cis*- β -carotene (solid line)..... 86

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*)

- Figura 1.** Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, das antocianinas de jambolão. Picos identificados de acordo com a Tabela 2. Condições cromatográficas: ver texto. 113
- Figura 2.** Estruturas das agliconas dos compostos fenólicos encontrados em jambolão. (dhm – diidromirecetina) 115
- Figura 3.** Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, de compostos fenólicos de jambolão. Picos de 1 a 12 identificados de acordo com a Tabela 3. Os picos de A a F referem-se, respectivamente, às antocianinas: dpn 3,5-diglucosídeo, cyd 3,5-diglucosídeo, ptd 3,5-diglucosídeo, dpn 3-glucosídeo, mvd 3,5-diglucosídeo, ptd 3-glucosídeo. Condições cromatográficas: ver texto. 118

- Figura 4.** Biossíntese de flavonoides. Enzimas: 4CL – 4-coumarato:CoA ligase; CHS – chalcona sintase; CHI – chalcona isomerase; FNS – flavona sintase; FHT – flavanona 3-hidroxilase; FLS – flavonol sintase; DFR – diidroflavonol 4-redutase; ANS – antocianidina sintase; FGT – flavonoide 3-O-glucosil-transferase. Adaptada de Heller & Forkmann (1994). 123
- Figura 5.** Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, dos carotenoides de jambolão. Picos identificados de acordo com a Tabela 4. Condições cromatográficas: ver texto. 126
- Figura 6.** Estruturas de alguns carotenoides encontrados em jambolão. 129
- Figura 7.** Espectros UV-visível obtidos a partir do extrato funcional (EF) diluído, a uma proporção de 0,35 %_{v/v}, nas soluções: (a) KCl/HCl (0,25 mol/L) com pH 1,0; (b) tampão citrato (0,4 mol/L) com pH 3,0; (c) tampão citrato (0,4 mol/L) com pH 5,0; (d) tampão fosfato (0,4 mol/L) com pH 7,0; (e) tampão borato (0,4 mol/L) com pH 9,0..... 130
- Figura 8.** Decaimento da absorbância do DMA, a 375 nm, na presença (●) e na ausência (■) de extrato funcional, nas condições de pH 1,0 (esquerda) e 3,0 (direita). 132

CAPÍTULO V

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ANTOCIANINA CIANIDINA 3-GLUCOSÍDEO EM SISTEMA MIMETIZADOR DE MEMBRANAS

- Figura 1.** Transformações estruturais da cianidina 3-glucosídeo em solução aquosa. K_a – constante de equilíbrio de desprotonação, K_h – constante de equilíbrio de hidratação; K_T – constante de equilíbrio de tautomerização, K_I – constante de equilíbrio de isomerização. ... 153

- Figura 2.** Espectros UV-visível da cianidina 3-glucosídeo (18,1 $\mu\text{mol/L}$) em (a) pH 3,1 (solução tampão citrato 12 mmol/L) e (b) pH 7,4 (solução tampão fosfato salino 12 mmol/L). 154
- Figura 3.** Estruturas do lipídio fluorescente C_{11} -BODIPY nas formas (A) não oxidada e (B) após oxidação induzida por radicais livres. Adaptado de Drummen *et al.* (2004). 155
- Figura 4.** Espectros de emissão obtidos para lipossomas com C_{11} -BODIPY e sem cyd 3-glucosídeo (A) e lipossomas sem C_{11} -BODIPY com 50 $\mu\text{mol/L}$ de cyd 3-glucosídeo (B), em meios com pH 3,1 e pH 7,4. Condições: $\lambda_{\text{excitação}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 560\text{-}740 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{excitação}} = 2,5 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{emissão}} = 5 \text{ nm}$ 156
- Figura 5.** Variação da intensidade de fluorescência do C_{11} -BODIPY em lipossomas preparados em condições de pH 3,1 e pH 7,4, na ausência de AAPH (■) e na presença de 40 mmol/L de AAPH para LC (●), C3G-1 (□), C3G-2 (▲) e C3G-3 (○). Condições: $\lambda_{\text{excitação}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 596 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{excitação}} = 2,5 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{emissão}} = 5 \text{ nm}$ 157
- Figura 6.** Efeito protetor da oxidação lipídica em lipossomas em função da concentração de cyd 3-glucosídeo, em sistemas com pH 3,1 (■) e pH 7,4 (●), após 40 min de reação. 158

CAPÍTULO VI

CHARACTERIZATION AND SINGLET OXYGEN QUENCHING ABILITY OF GUM ARABIC AND MALTODEXTRIN SPRAY-DRIED MICROCAPSULES CONTAINING ANTIOXIDANT MOLECULES

- Figure 1.** Structures of carotenoids (A) and tocopherol derivatives (B) used in this study. 171

- Figure 2.** (I) SEM micrographs (magnified 4000 \times ; acceleration voltage of 10 kV) and (II) particle size distribution (by DLS measurements) obtained from microcapsules containing apo-12'-carotenal (A12) prepared with: (A) gum arabic (GA) and (B) maltodextrin 20DE (MD) as wall material. 178
- Figure 3.** Pyrene emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 326$ nm) of 0.7 $\mu\text{mol/L}$ Py (a), 0.3 $\mu\text{mol/L}$ Py-MD (b), and 1.3 $\mu\text{mol/L}$ Py-GA (c), all in water. Pyrene excitation spectra of 1.3 $\mu\text{mol/L}$ Py-GA obtained at emission wavelength of 370 nm (d) and 480 nm (e). **Inset:** Variation of the excimer (460 nm) to monomer (375 nm) intensity ratio, $I_{\text{E}}/I_{\text{M}}$, as a function of the pyrene concentration. 180
- Figure 4.** Fluorescence quenching of pyrene ($\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm) by dissolved molecular oxygen in gum arabic microcapsule solutions. **Inset:** Stern-Volmer plot (eq. 5) in water, gum arabic and maltodextrin microcapsule solutions. 182
- Figure 5.** Plot of eqn. 6 for the quenching of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by antioxidants (AOx) in acetonitrile solutions. **Inset:** phosphorescence decay of $^1\text{O}_2$ in the absence and presence of β -carotene (BC) and the respective residual values for the monoexponential fitting. 184
- Figure 6.** Quenching of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in D_2O by (A) "empty" microcapsules of gum arabic (GA) or maltodextrin 20DE (MD), eqn. 6; (B) BC-MD and TP-MD microcapsules, eqn. 6, (C) BC-GA and TX-GA microcapsules, eqn. 7. BC: β -carotene, TP: tocopherol, TX: trolox. 187
- Figure 7.** Ratio of the rate constant quenching of $^1\text{O}_2$ by antioxidant quenchers (AOx) between microcapsule of gum arabic (GA) or maltodextrin 20DE (MD) in D_2O and acetonitrile solutions. TP: tocopherol, TX: trolox, BC: β -carotene, A8: apo-8'-carotenal, and A12: apo-12'-carotenal. 189

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A12	apo-12'-carotenal
A8	apo-8'-carotenal
AAPH	diidrocloreto de α,α' -azodiisobutiramidina
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACN	acetonitrila
AM	antocianinas monoméricas
AOx	antioxidante
APCI	ionização química a pressão atmosférica
BC	β -caroteno
BSA	albumina bovina
c.d.b.	ligação dupla conjugada
C ₁₁ -BODIPY	ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diazas-indaceno-3-undecanoico
C3G	lipossoma contendo cianidina 3-glucosídeo
CE	equivalente de catequina
CT	transferência de carga
cv.	cultivar
cyd 3-glu	cianidina 3-glucosídeo
DAD	detector de arranjo de diodo
dhm	diidromirecetina
DLS	espalhamento de luz dinâmico (<i>dynamic light scattering</i>)
DMA	dimetilantraceno
dpn	delfinidina
EC ₅₀	concentração de antioxidante necessária para obter 50 % de proteção
EET	transferência de energia eletrônica
EF	extrato funcional
ESI	ionização por <i>electrospray</i>

FD	fator de diluição
GA	goma arábica
GAE	equivalente de ácido gálico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
LC	lipossomas controle
LUV	lipossoma unilamelar grande
MB	azul de metileno
MC	microcápsula
MD	maltodextrina
ME	eficiência de microencapsulação
MeOH	metanol
MLV	lipossoma multilamelar
MS	espectrometria de massas
MTBE	eter metil <i>tert</i> -butílico
mvd	malvidina
NMR	ressonância magnética nuclear
OCC	cromatografia em coluna aberta
PM ou MW	peso molecular
pnd	peonidina
ptd	petunidina
Py	pireno
RAE	equivalente da atividade de retinol
RB	rosa de bengala
ROS	espécie reativa de oxigênio
SEM	microscopia eletrônica de varredura
SUV	lipossoma unilamelar pequeno
TAE	equivalente de ácido tânico
TEA	triethylamina
TEAC	capacidade antioxidante equivalente a Trolox
TLC	cromatografia em camada delgada

TP	α -tocoferol
TRDP	detecção de fosforescência resolvida no tempo
TX	Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%A_B/A_{II}$	intensidade de pico <i>cis</i>
$\%III/II$	estrutura fina espectral
ϵ	absortividade molar [L/mol.cm]
τ_0	tempo de meia-vida do 1O_2 por decaimento natural
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
$\lambda_{m\acute{a}x}$	comprimento de onda de máxima absorção
$E_{1cm}^{1\%}$	coeficiente de absorvidade [100 mL/g.cm]
I_E/I_M	razão entra as intensidades das bandas de emissão referentes ao excímero (460 nm) e ao monômero (371 nm) do pireno
I_I/I_{III}	razão entre as intensidades das bandas de emissão I (371 nm) e III (383 nm) do pireno
k_{Δ}	constante de decaimento do 1O_2 observada
k_{Δ}^0	constante de decaimento natural do 1O_2 observada
K_a	constante de equilíbrio de desprotonação
k_c	constante de desativação química de oxigênio singlete
k_{DMA}	constante de decaimento da absorbância do DMA, a 375 nm, na ausência de extrato funcional
k_{DMA+EF}	constante de decaimento da absorbância do DMA, a 375 nm, na presença de extrato funcional
k_{et}	constante de transferência de energia
K_h	constante de equilíbrio de hidratação
k_p	constante de supressão física de oxigênio singlete
k_Q	constante de desativação total de oxigênio singlete
1O_2	oxigênio molecular no estado singlete
3O_2	oxigênio molecular no estado fundamental triplete
r	anisotropia

RESUMO GERAL

Considerando a importância de carotenoides e antocianinas, tanto como pigmentos naturais como pelas suas propriedades antioxidantes, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS), a composição de carotenoides e antocianinas em nêspera, jaca e jambolão, bem como estudar a atividade antioxidante apresentada por esses pigmentos em diferentes sistemas. Em função da coloração desses frutos, apenas o jambolão foi submetido à análise de antocianinas. Cinco cultivares brasileiros de nêspera foram avaliados: Centenária, Mizauto, Mizuho, Mizumo e Néctar de Cristal. De vinte e cinco carotenoides separados, vinte e três foram identificados, sendo que os principais foram *all-trans*- β -caroteno (19-55 %), *all-trans*- β -criptoxantina (18-28 %), 5,6:5',6'-diepóxi- β -criptoxantina (9-18 %) e 5,6-epóxi- β -criptoxantina (7-10 %). Os conteúdos de carotenoides totais variaram entre 196 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (cv. Néctar de Cristal) e 3020 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (cv. Mizumo). Os cultivares Mizauto, Mizuho, Mizumo e Centenária apresentaram valores de pró-vitamina A entre 89 e 162 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$ e podem ser considerados uma boa fonte desta pró-vitamina. Nos três lotes de jaca analisados, quatorze dos dezoito carotenoides identificados foram relatados pela primeira vez, sendo que os principais foram *all-trans*-luteína (24-44 %), *all-trans*- β -caroteno (24-30 %), *all-trans*-neoxantina (4-19 %), 9-*cis*-neoxantina (4-9 %) e 9-*cis*-violaxantina (4-10 %). O lote A apresentou o menor conteúdo de carotenoides totais (34,1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) e o menor valor de pró-vitamina A (0,8 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$), enquanto nos lotes B e C, os conteúdos de carotenoides totais foram de 129,0 e 150,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e os valores de pró-vitamina A foram 3,3 e 4,3 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$, respectivamente. Os frutos de jambolão apresentaram dois carotenoides principais: *all-trans*-luteína (43,7 %) e *all-trans*- β -caroteno (25,4 %). A composição de antocianinas foi marcada pela presença de diglucosídeos de cinco das seis agliconas comumente encontradas

em alimentos, sendo que as principais antocianinas foram delphinidina 3,5-diglucosídeo (45 %), petunidina 3,5-diglucosídeo (32 %) e malvidina 3,5-diglucosídeo (15 %). Esse padrão também foi observado para outros flavonoides, onde os principais compostos identificados foram diglucosídeos de diidromirecetina, metil-diidromirecetina e dimetil-diidromirecetina, além de mirecetina glucosídeo e um éster de galoil-glucose. A atividade antirradical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) do extrato funcional rico em antocianinas, obtido de frutos de jabolão, foi dependente do pH do meio, com valores de TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox) entre 4,8 μmol Trolox/g fruta (pH 1,0) e 12,7 μmol Trolox/g fruta (pH 5,0). Esse extrato funcional apresentou cerca de 60 % de proteção ao dimetilantraceno frente à oxidação por oxigênio singlete, em condições de pH 1,0 e 3,0, sendo essa atividade superior àquela apresentada por outras frutas vermelhas. Padrão de cianidina 3-glucosídeo foi incorporado em lipossomas unilamelares grandes (LUV) preparados em duas condições diferentes de pH (3,1 e 7,4), sendo esses sistemas submetidos a oxidação induzida por AAPH (diidroclorato de α,α' -azodiisobutiramidina) a 37 °C. Observou-se que as formas de cianidina 3-glucosídeo presentes no meio com pH 7,4 (hemiacetais e/ou chalconas e bases quinonoidais), com $\text{EC}_{50} = 9,3 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/L}$ (concentração de antioxidante necessária para obter 50 % de proteção), apresentaram uma atividade 2,6 vezes maior que as formas presentes no meio com pH 3,1 (maior proporção de cátion flavílium e hemiacetais), cujo EC_{50} foi de $23,6 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/L}$. Por fim, padrões de carotenoides, trolox e tocoferol foram microencapsulados com dois materiais de parede diferentes, goma arábica (GA) e maltodextrina (MD), por meio da técnica de *spray-drying*. Quando comparada a MD, a parede de GA formou domínios hidrofóbicos mais rígidos e compactos, melhorando a solubilização de moléculas apolares e reduzindo a acessibilidade de moléculas de oxigênio. Devido a efeitos de compartimentalização das moléculas de antioxidante nas microcápsulas (MC), as constantes de desativação total (k_Q) de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) foram cerca de duas ordens de magnitude menores nas soluções de MC, quando comparadas aos valores de k_Q em meio homogêneo.

SUMMARY

Considering the importance of carotenoids and anthocyanins, as both natural pigments and antioxidants, the present study was carried out to evaluate, by high-performance liquid chromatography connected to a photodiode array and a mass spectrometry detector (HPLC-DAD-MS/MS) the composition of carotenoids and anthocyanins from loquat, jackfruit and jabolão fruits, as well as to study the antioxidant activity showed by these pigments in different systems. Due to the colour of these fruits, only jabolão was submitted to anthocyanin analysis. Five loquat cultivars from Brazil were evaluated: Centenária, Mizauto, Mizuho, Mizumo and Néctar de Cristal. Twenty five carotenoids were separated, and twenty three of them were identified. The main carotenoids were all-*trans*- β -carotene (19-55 %), all-*trans*- β -cryptoxanthin (18-28 %), 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin (9-18 %) and 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin (7-10 %). The total carotenoid contents ranged from 196 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (cv. Néctar de Cristal) to 3020 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (cv. Mizumo). Cultivars Mizauto, Mizuho, Mizumo and Centenária showed provitamin A values between 89 and 162 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$, and can be considered good source of this provitamin. In the three analyzed batches of jackfruit, fourteen of the eighteen identified carotenoids were reported for the first time in this fruit. The major carotenoids were all-*trans*-lutein (24-44 %), all-*trans*- β -carotene (24-30 %), all-*trans*-neoxanthin (4-19 %), 9-*cis*-neoxanthin (4-9 %) and 9-*cis*-violaxanthin (4-10 %). Batch A showed the lowest total carotenoid content (34.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and provitamin A value (0.8 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$), whereas for batches B and C, respectively, the total carotenoid contents were 129.0 and 150.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and the provitamin A values were 3.3 and 4.3 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$. The jabolão fruits showed two main carotenoids: all-*trans*-lutein (43.7 %) and all-*trans*- β -carotene (25.4 %). The anthocyanin composition was marked by the presence of diglucosides of five among the six aglycones that are commonly found in foods. The major anthocyanins were delphinidin 3,5-diglucoside (45 %), petunidin 3,5-diglucoside (32 %) and malvidin 3,5-diglucoside (15 %). This pattern

was also observed for other flavonoids, where the main identified compounds were diglucosides of dihydromyricetin, methyl-dihydromyricetin, and dimethyl-dihydromyricetin, in addition to myrecetin glucoside and a galoyl-glucose ester. The scavenging capacity of ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) showed by the anthocyanin-rich functional extract from jambolão fruits, was dependent on the medium pH, showing TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) values between 4.8 $\mu\text{mol Trolox/g fruit}$ (pH 1.0) and 12.7 $\mu\text{mol Trolox/g fruit}$ (pH 5.0). This functional extract showed about 60 % of protection on dimethylantracene oxidation by singlet oxygen, in pH conditions of 1.0 and 3.0, being this activity higher than those showed by other red fruits. Cyanidin 3-glucoside standard was incorporated to large unilamellar liposomes (LUV) prepared at two different pH conditions (3.1 and 7.4). These systems were submitted to oxidation induced by AAPH (α,α' -azodiisobutyramidine dihydrochloride) at 37 °C. The cyanidin 3-glucoside forms present in the medium at pH 7.4 (hemiacetals and/or chalcones and quinonoidal bases), with $\text{EC}_{50} = 9.3 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$ (antioxidant concentration required for 50 % protection), showed an activity 2.6 times higher than that showed by the forms present at pH 3.1 (higher proportion of flavylum cation and hemiacetals), whose EC_{50} was $23.6 \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$. Finally, carotenoids, trolox and tocopherol standards were microencapsulated with two different wall materials, gum arabic (GA) and maltodextrin (MD), by the spray-drying technique. GA wall formed more rigid and compacted hydrophobic domains than those in the MD microcapsules, improving the solubilization of apolar molecules and reducing the accessibility of oxygen molecules. Due to compartmentalization effects of antioxidant molecules in the microcapsules (MC), the quenching rate constants (k_Q) of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) were reduced almost two-orders of magnitude in MC solutions as compared with those observed in homogenous media.

INTRODUÇÃO GERAL

Os pigmentos naturais, tais como carotenoides e antocianinas, presentes naturalmente nos alimentos, ou adicionados propositalmente, proporcionam cor aos alimentos, contribuindo para o seu aspecto visual, o qual está relacionado à aceitação e escolha de um alimento por seus consumidores (Clydesdale, 1993). Paralelamente, os alimentos podem se beneficiar com a adição destes pigmentos naturais devido, por exemplo, ao seu potencial antioxidante, prevenindo a oxidação de alimentos e matérias-primas alimentares, como óleos, carnes, leite e seus derivados, estendendo sua vida-de-prateleira (Decker *et al.*, 2005).

Esses pigmentos também possuem importantes funções e ações biológicas, podendo ser considerados promotores da saúde humana (Krinsky, 1994; Kong *et al.*, 2003). Já é reconhecida a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a redução do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular e outras, sendo os pigmentos um dos grupos de compostos bioativos aos quais são atribuídos tais efeitos (Huang *et al.*, 2005; Lampe, 1999; Serdula *et al.*, 1996; Stanner *et al.*, 2004). Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação, ou seja, prevenção do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo ocorre quando há um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou espécies reativas de nitrogênio em relação à atividade do sistema antioxidante endógeno (enzimático e não enzimático), ocorrendo um desbalanço entre esses dois sistemas. As ROS incluem radicais livres, tais como os radicais superóxido, hidroxila, peroxila, hidroperoxila e alcóxila, e espécies não radicalares, tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (Choe & Min, 2006). Os estados pró-oxidantes

podem causar lesões celulares em órgãos importantes por meio de danos a componentes celulares, incluindo ácidos graxos polinsaturados, fosfolipídios, colesterol livre, DNA, proteínas e lipoproteínas. Os antioxidantes, ingeridos com a dieta ou presentes em alimentos, são capazes de retardar ou prevenir o processo oxidativo, por meio da interação com essas espécies reativas, desativando-as (Deshpande *et al.*, 1996).

Entre os métodos desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de uma amostra biológica, estão aqueles que envolvem a inibição de espécies reativas estáveis (Rice-Evans & Miller, 1994), como, por exemplo, o método que utiliza o cátion radical de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) (Re *et al.*, 1999). O oxigênio singlete (¹O₂) é outra espécie reativa muito utilizada para avaliar a atividade antioxidante de um composto, sendo importante pelo fato de ocorrer naturalmente nos processos oxidativos. Essa espécie geralmente é produzida no sistema sob avaliação por meio de métodos fotoquímicos, onde os sensibilizadores mais comumente usados são rosa de bengala e azul de metileno (Choe & Min, 2006).

O uso de lipossomas, como sistemas mimetizadores de membrana para avaliar a proteção conferida a um substrato por um antioxidante, tem sido estimulado devido à estrutura em bicamada, semelhante à fração lipídica de membranas celulares, apresentada por essas vesículas lipídicas. Além disso, o uso de lipossomas permite a avaliação tanto de compostos lipofílicos, presentes na membrana, como hidrofílicos, presentes na fase aquosa dos lipossomas (Roberts & Gordon, 2003).

A maioria dos compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, destaca-se pela capacidade de desativar radicais livres, sendo também eficientes como agentes quelantes de metais bivalentes capazes de produzir ROS através da reação de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1996). As antocianinas, na forma de cátion flavílium, também podem apresentar boa eficiência como desativadores de ¹O₂, com valores de k_Q da ordem de $10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, como demonstrado por De Rosso *et*

al. (2008). Embora os carotenoides sejam capazes de desativar radicais livres, a desativação de $^1\text{O}_2$ constitui o principal mecanismo de ação desses pigmentos, que são considerados os desativadores de $^1\text{O}_2$ mais eficientes (k_Q na faixa de 10^9 - 10^{10} $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (Di Mascio *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1996).

Por outro lado, devido às estruturas químicas dos carotenoides e antocianinas, caracterizadas pela presença de ligações duplas conjugadas, esses pigmentos são sensíveis a fatores como luz, calor, oxigênio e condições de pH do meio, podendo sofrer degradação quando expostos a tais fatores (Furtado *et al.*, 1993; Mercadante, 2008; Mercadante & Bobbio, 2008). Dessa forma, para facilitar o uso desses pigmentos como corantes em alimentos, é desejável aumentar a sua estabilidade e uma das alternativas para isso é a microencapsulação.

A microencapsulação é definida como um processo no qual partículas muito pequenas ou gotículas são recobertas por um revestimento, ou são embebidas em uma matriz homogênea ou heterogênea, obtendo-se pequenas cápsulas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Além de tornar mais fácil o manuseio do composto ativo, o objetivo da microencapsulação é proteger o material de recheio contra condições adversas do ambiente, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos. Dessa forma, essa técnica aumenta a vida-de-prateleira e estabiliza o material de recheio (Shahidi & Han, 1993). Na indústria de alimentos, o processo por *spray-dryer*, utilizando polissacarídeo como material de parede, é o método mais comumente empregado no preparo de microcápsulas (Risch, 1995), sendo que a goma arábica e a maltodextrina são os materiais de parede mais usados.

Vários pesquisadores se dedicaram a avaliar o efeito da microencapsulação sobre a estabilidade dos carotenoides, entre eles Barbosa *et al.* (2005); Desobry *et al.* (1999) e Rodriguez-Huezo *et al.* (2004). No entanto, existem poucos estudos a respeito das propriedades antioxidantes desses compostos após a microencapsulação por *spray-dryer*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, M.I.M.J.; Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, 989-994, 2005.
- Choe, E.; Min, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 1-22, 2006.
- Clydesdale, F.M. Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 83-101, 1993.
- De Rosso, V.V.; Vieyra, F.E.M.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radical Research*, 42, 885-891, 2008.
- Decker, E.A.; Warner, K.; Richards, M.P.; Shahidi, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4303-4310, 2005.
- Deshpande, S.S.; Deshpande, U.S.; Salunkhe, D.K. *Nutritional and health aspects of food antioxidants*. In: Food antioxidants – technological, toxicological, and health perspectives. D.L. Madhavi; S.S. Deshpande; D.K. Salunkhe (Eds.). Marcel Dekker, New York, p.361-469, 1996.
- Desobry, S.A.; Netto, F.M.; Labuza, T.P. Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23, 39-55, 1999.
- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274, 532-538, 1989.

-
- Furtado, P.; Figueiredo, P.; Neves, H.C.das; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 75, 113-118, 1993.
- Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121, 2007.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856, 2005.
- Kong, J. M.; Chia, L.S.; Goh, N.K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933, 2003.
- Krinsky, N.I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010, 1994.
- Lampe, J.W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475S-490S, 1999.
- Mercadante, A.Z. *Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.213-240, 2008.
- Mercadante, A.Z.; Bobbio, F.O. *Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.241-276, 2008.
- Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 384, 240-242, 1996.

-
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293, 1994.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, 1996.
- Risch, S.J. *Encapsulation: overview of uses and techniques*. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (Eds.). ACS Symp. Ser. 590, Washington, p. 2-7, 1995.
- Roberts, W.G.; Gordon, M.H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1486-1493, 2003.
- Rodríguez-Huezo, M.E.; Pedroza-Islas, R.; Prado-Barragán, L.A.; Beristain, C.I.; Vernon-Carter E.J. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, 351-359, 2004.
- Serdula, M.K.; Byers, T.; Mokdad, A.H.; Simoes, E.; Mendlein, J.M.; Coates, R.J. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. *Epidemiology*, 7, 161-165, 1996.
- Shahidi, F.; Han, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547, 1993.
- Stanner, S.A.; Hughes, J.; Kelly, C.N.M.; Buttriss, J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutrition*, 7, 407-422, 2004.

OBJETIVOS

Considerando a importância de carotenoides e antocianinas, tanto por suas propriedades corantes como por suas propriedades antioxidantes, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Determinar por HPLC-DAD-MS/MS a composição de carotenoides presentes em nêspera e jaca.
- 2) Determinar por HPLC-DAD-MS/MS a composição de carotenoides e antocianinas presentes em jambolão.
- 3) Estudar a atividade antioxidante, em diferentes condições de pH, de um extrato rico em antocianinas obtido a partir de jambolão, frente ao radical ABTS e ao oxigênio singlete.
- 4) Avaliar a ação antioxidante, em diferentes condições de pH, da cianidina 3-glucosídeo em um sistema mimetizador de membranas lipídicas.
- 5) Microencapsular carotenoides, por meio da técnica de *spray-dryer*, utilizando diferentes materiais de parede.
- 6) Caracterizar as microcápsulas obtidas quanto à morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, comportamento em meio aquoso e permeabilidade ao oxigênio quando em solução.
- 7) Avaliar o efeito da microencapsulação dos carotenoides como supressores (*quencher*) de oxigênio singlete.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Propriedades físico-químicas de carotenoides e antocianinas

1.1. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis de coloração amarela a vermelha, encontrados no reino vegetal, animal e em microrganismos. Plantas superiores e microrganismos sintetizam esses pigmentos, enquanto que os animais são incapazes de sintetizá-los, de forma que a presença de carotenoides nestes se deve à ingestão por meio da dieta.

A estrutura básica dos carotenoides é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro. Os carotenoides são derivados do fitoeno, cuja estrutura é modificada por meio de reações de dessaturação sequenciais que levam à formação de fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno e licopeno. A partir do neurosporeno e do licopeno são formados muitos outros carotenoides, por meio de novas modificações em sua estrutura, tais como dessaturação, ciclização em um ou nos dois grupos terminais, introdução de grupos funcionais contendo oxigênio, encurtamento da cadeia, entre outras (Britton, 1998; Fraser & Bramley, 2004).

Os carotenoides são inicialmente divididos em dois grandes grupos, os carotenos que quimicamente são hidrocarbonetos e as xantofilas que são derivados oxigenados. Neste último grupo estão incluídos pigmentos que possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos e/ou epóxidos. Os grupos terminais podem ser também acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Muitas outras modificações estruturais ainda são possíveis, permitindo a obtenção de uma diversidade de estruturas químicas, com mais de 600 carotenoides já isolados (Britton, 1995; Britton *et al.*, 2004). A Figura 1 ilustra alguns exemplos de diferentes estruturas de carotenoides comumente encontrados em alimentos, sendo que a estrutura do β -caroteno foi numerada para mostrar o sistema de numeração normalmente utilizado para esses pigmentos.

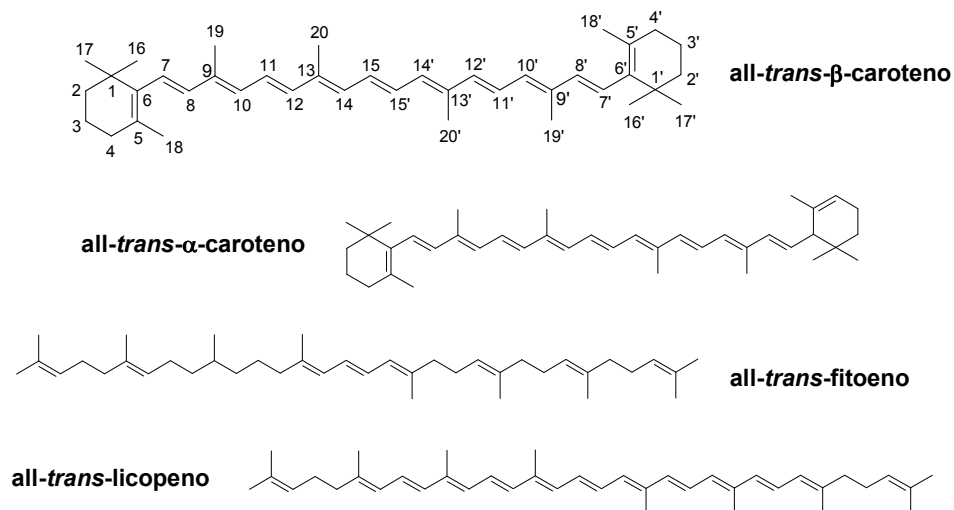
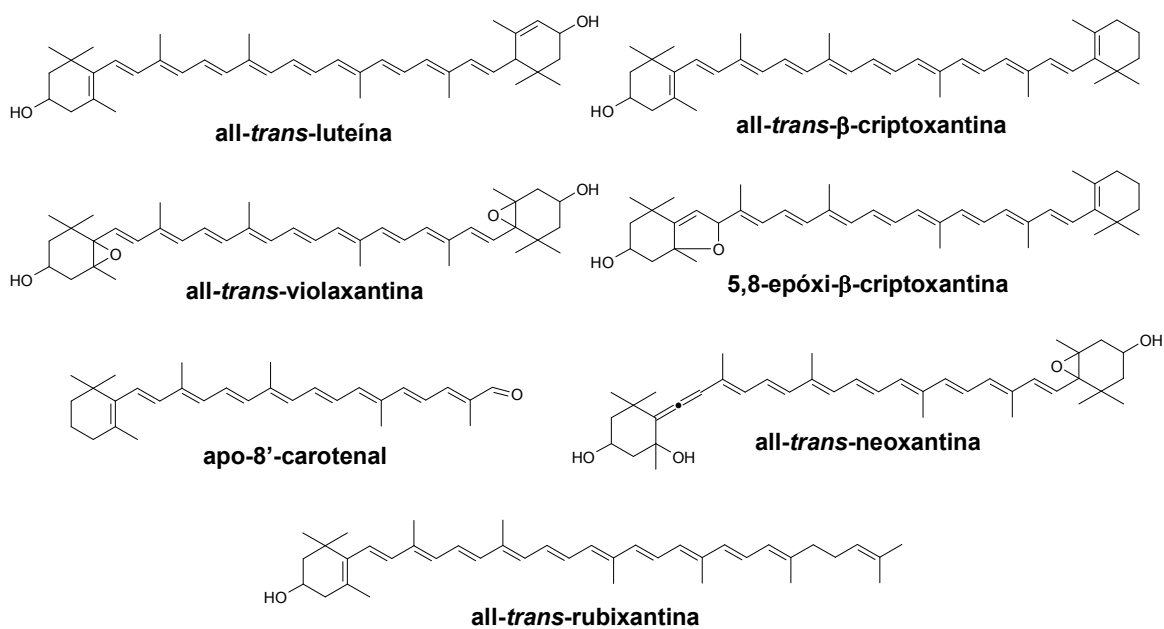
CAROTENOS

XANTOFILAS


Figura 1. Estruturas moleculares de carotenoides.

Dessa forma, os carotenoides apresentam na sua cadeia uma série de ligações duplas conjugadas (c.d.b.), gerando por ressonância um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas

substâncias alta reatividade química e absorção de luz na região do visível. Quanto maior o número de c.d.b. na estrutura do carotenoide, mais extenso é o cromóforo e, por conseguinte, maior o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). O β -caroteno, por exemplo, possui 11 c.d.b. e apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ em 425, 450 e 478 nm, enquanto que a violaxantina, que possui 9 c.d.b., apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ em 419, 440 e 470 nm (Figura 1). A presença de c.d.b. em anel conjugada à cadeia poliênica do carotenoide também proporciona diferenças no cromóforo, como se observa comparando-se os $\lambda_{\text{máx}}$ de licopeno (444, 470, 502 nm) e β -caroteno (425, 450, 478 nm), ambos com 11 c.d.b. São necessárias pelo menos 7 ligações duplas conjugadas para que um carotenoide apresente cor. Assim, o fitoeno (Figura 1), que apresenta apenas 3 c.d.b., e o fitoflueno, que possui estrutura similar a do fitoeno porém com 5 c.d.b., são carotenoides incolores, apresentando bandas de absorção em 276, 286, 297 nm e 331, 347, 367 nm, respectivamente (Britton, 1995; Britton *et al.*, 2004).

Por outro lado, a alta reatividade química proporcionada pelo sistema de ligações duplas conjugadas torna esses pigmentos susceptíveis à degradação sob condições de alta temperatura, meio ácido, na presença de luz, de espécies reativas de oxigênio, entre outros fatores, podendo sofrer isomerização geométrica e oxidação. Essas alterações levam à perda do poder corante e perda/diminuição da atividade biológica como, por exemplo, da atividade pró-vitamina A, ou ainda podem formar compostos de baixo peso molecular que influenciam no aroma dos alimentos (Mercadante, 2008).

1.2. Antocianinas

As antocianinas compreendem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis do reino vegetal e são especialmente características das angiospermas, estando presentes principalmente em flores e frutos, sendo responsáveis por sua coloração azul, vermelha, violeta ou púrpura.

Esses pigmentos pertencem à classe dos compostos flavonoides e são considerados derivados polihidroxilados e polimetoxilados do cátion flavílium com

15 carbonos ($C_6-C_3-C_6$), que constitui a sua unidade estrutural. O cátion flavílium encontra-se normalmente glicosilado, sendo que também pode ocorrer a presença de ácidos ligados aos açúcares (Strack & Wray, 1994).

O grande número de antocianinas diferentes, mais de 500, encontrado em plantas é devido à variação na natureza do glicosídeo e do ácido, já que até hoje, apenas 15 agliconas foram caracterizadas. Cerca de 50 destas antocianinas estão presentes na maioria das frutas já estudadas. Em alimentos, as agliconas são representadas pelas seis antocianidinas mais comuns, das quais a cianidina é a mais frequente, seguida de peonidina e delphinidina, e por fim pelargonidina, malvidina e petunidina (Mercadante & Bobbio, 2008; Wu & Prior, 2005). As estruturas dessas antocianidinas são ilustradas na Figura 2, onde também são mostrados o sistema de numeração e a identificação dos anéis A e B, normalmente utilizados para esses pigmentos.

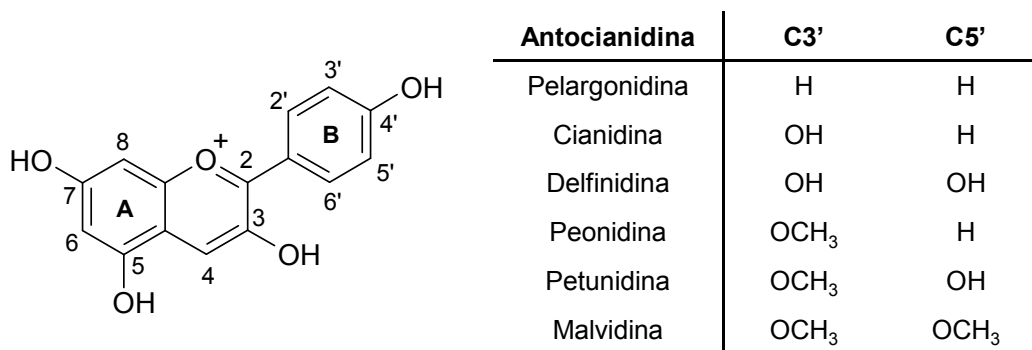


Figura 2. Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos. As colunas C3' e C5' correspondem aos grupos funcionais ligados aos carbonos 3' e 5', respectivamente.

A maioria das antocianinas em alimentos contém uma ou mais unidades de monossacarídeos, mais comumente glicosilados na posição 3, algumas vezes em

3,5 e mais raramente em 3,7. Os monossacarídeos mais comumente encontrados são glucose, galactose, ramnose, xilose e arabinose. Entre os dissacarídeos, a rutinose (ramnosil-(1,6)-glucosídeo) é o que ocorre com maior frequência em antocianinas de alimentos. No entanto, outros dissacarídeos também podem ser encontrados, quais sejam soforose (2-glucosil-glucosídeo), sambubiose (2-xilosil-glucosídeo), latirose (2-xilosil-galactosídeo) e laminariobiose (3-glucosil-glucosídeo) (Mercadante & Bobbio, 2008; Strack & Wray, 1994).

A influência do pH sobre a cor e a estabilidade das antocianinas é bem conhecida; em solução aquosa há uma mistura de diversas estruturas em equilíbrio químico: cátion flavílium (vermelho), bases quinonoidais (azul), pseudobases carbinol ou hemiacetais (incolor) e chalconas (amarelo claro/incolor). Os valores das constantes de equilíbrio determinam as principais espécies presentes e a cor da solução. Se a constante de equilíbrio de desprotonação (K_a) é maior que a constante de equilíbrio de hidratação (K_h), o equilíbrio é deslocado para a formação da base quinonoidal (A) e se $K_h > K_a$ o equilíbrio é deslocado para a formação dos hemiacetais (B) que estão em equilíbrio com as espécies *all-trans*- e *cis*-chalcona (C). A quantidade relativa de cada forma em equilíbrio varia em função do pH e da estrutura da antocianina (Houbiers *et al.*, 1998; Mercadante & Bobbio, 2008). Em pH inferior a 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma de cátion flavílium (AH^+) (Brouillard, 1982). A Figura 3 apresenta o esquema das transformações estruturais de antocianinas em solução aquosa ácida.

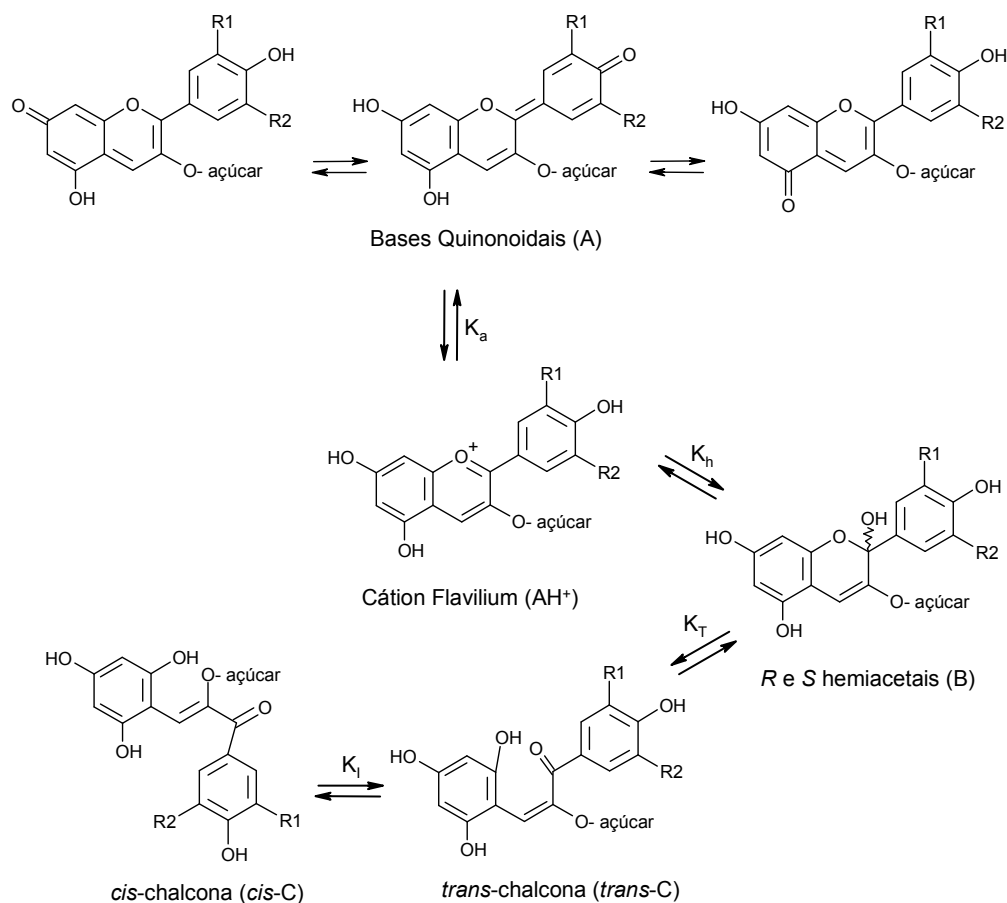


Figura 3. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa ácida. Adaptado de Mercadante & Bobbio (2008).

A estabilidade das antocianinas é influenciada ainda pela presença de calor, luz e oxigênio, que levam a degradação desses pigmentos com consequente formação de compostos poliméricos e derivados do ácido benzoico e do benzaldeído como produtos finais (Furtado *et al.*, 1993). Além disso, como o cátion flavílium é deficiente em elétrons, esta espécie é altamente reativa, instável e susceptível a ataques por reagentes nucleofílicos, tais como água, peróxidos e dióxido de enxofre.

As substituições presentes no cátion flavílium, tais como grupos hidroxila, metoxila, açúcares e açúcares acilados, têm efeito marcante na intensidade da cor

e na estabilidade destes pigmentos. As antocianinas de estruturas mais complexas são relativamente mais resistentes ao efeito do calor e luz quando comparadas às antocianinas não aciladas (Mercadante & Bobbio, 2008). A aglicona cianidina apresenta valor de pK_h menor que os valores de pK_h das cianidinas glicosiladas e aciladas, indicando menor resistência da antocianidina a hidratação. Além disso, a glicosilação na posição 5 da antocianidina diminui a constante de hidratação (K_h), pois a redução na densidade eletrônica do anel pirilium favorece o ataque nucleofílico da água, aumentando a formação de hemiacetal (Stintzing *et al.*, 2002). Iacobucci & Sweeney (1983) verificaram que o tempo de meia-vida da cianidina-3-rutinosídeo em pH 2,8, à temperatura ambiente, foi de 65 dias, enquanto que o da aglicona cianidina foi de apenas 12 h nas mesmas condições.

2. Composição de carotenoides e antocianinas em frutas

A composição de carotenoides e antocianinas em frutas é influenciada pelo estágio de maturação dos frutos, assim como por fatores genéticos, geográficos e/ou de condições de cultivo da planta, uma vez que esses fatores influenciam as vias de biossíntese desses pigmentos (Britton, 1998; Siriwoharn *et al.*, 2004). Estudos com diferentes cultivares de *Citrus* (Dhuique-Mayer *et al.*, 2005), *Capsicum annuum* (Collera-Zúñiga *et al.*, 2005), *Hippophae rhamnoides* (Raffo *et al.*, 2004), amora preta (Siriwoharn *et al.*, 2004) e framboesa (Ancos *et al.*, 1999), por exemplo, mostram a influência do fator genético na composição de carotenoides e/ou flavonoides. Por outro lado, estudos com amostras de manga provenientes da Bahia (Mercadante *et al.*, 1997) e de São Paulo (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998) demonstram a influência do fator geográfico na composição de carotenoides.

Dos mais de 600 carotenoides que ocorrem na natureza, somente cerca de 100 foram listados como presentes em frutas e vegetais (Fraser & Bramley, 2004). A composição de carotenoides de várias frutas tropicais, tais como acerola (De

Rosso & Mercadante, 2005), cajá (Hamano & Mercadante, 2001), caju (Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981, Assunção & Mercadante, 2003), camu-camu (Zanatta & Mercadante, 2007), mamão papaya (Kimura *et al.*, 1991), maracujá (Silva & Mercadante, 2002) e manga (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1989; Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998) já foi determinada, mas ainda existem muitas frutas ou novos cultivares cujas composições devem ser determinadas. Além disso, várias outras merecem ser re-avaliadas através de técnicas com maior poder de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou que permitam a confirmação da identidade, como o uso de detectores de arranjo de diodos (DAD) e de espectrometria de massas (MS) acoplados ao HPLC.

A composição de carotenoides de alguns cultivares de nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl., ROSACEAE) foi avaliada por vários pesquisadores, que empregaram cromatografia em camada delgada (TLC) (Kon & Shimba; 1988), cromatografia em coluna aberta (OCC), TLC e MS (Gross *et al.*, 1973), OCC e TLC (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1995), e HPLC (Breithaupt *et al.*, 2002). Em todos os cultivares estudados (Tai, Tanaka, Golden Nugget e alguns cultivares não especificados), os principais carotenoides encontrados foram β -criptoxantina e β -caroteno.

Em jaca (*Artocarpus heterophyllus*, MORACEAE) foram encontrados os carotenoides luteína, β -criptoxantina, α -caroteno e β -caroteno, em estudos que utilizaram OCC ou HPLC (Chandrika *et al.*, 2005; Setiawan *et al.*, 2001; Tee & Lim; 1991). Além desses carotenoides, foram identificados crocetina (Chandrika *et al.*, 2005) e licopeno (Setiawan *et al.*, 2001) nessa fruta, apesar da cor clara da polpa da jaca e de crocetina ser um carotenoide que, até então, só havia sido encontrado em açafrão e gardênia (Caballero-Ortega *et al.*, 2007; Pfister *et al.*, 1996).

A composição de antocianinas de diversas frutas, especialmente as de clima temperado, tem sido estudada ao longo dos anos. Recentemente, pesquisadores re-avaliaram a composição de antocianinas de frutas como

blackcurrant (Nielsen *et al.*, 2003), cereja azeda (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004), morango (Cordenunsi *et al.*, 2002) e framboesa (Beekwilder *et al.*, 2005) utilizando HPLC. Nos últimos anos, HPLC-DAD-MS/MS, às vezes acompanhada de ressonância magnética nuclear (NMR), tem sido aplicada na determinação da composição de antocianinas de algumas frutas tropicais, como açaí (Gallori *et al.*, 2004), baguaçu (Kuskoski *et al.*, 2003), acerola (De Rosso *et al.*, 2008a; Hanamura *et al.*, 2005) e camu-camu (Zanatta *et al.*, 2005).

As principais antocianinas de jambolão foram identificadas como 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina (Brito *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Veigas *et al.*, 2007). No entanto, não foram encontradas na literatura informações a respeito da identificação de compostos fenólicos não antociânicos, assim como de carotenoides, em frutos de jambolão.

O Quadro 1 apresenta algumas frutas, representantes das famílias MORACEAE, MYRTACEAE e ROSACEAE, cujos pigmentos, carotenoides e/ou antocianinas, foram investigados. Devido à grande diferença estrutural entre carotenoides e antocianinas, não é surpresa que poucos pesquisadores tenham determinado a composição de ambos pigmentos na mesma amostra. Sian & Ishak (1991) determinaram os teores totais de carotenoides e antocianinas em mamão e abacaxi. Entretanto, os pigmentos não foram identificados. Em nosso grupo, a composição de carotenoides e de antocianinas foi avaliada em duas variedades de acerola provenientes de duas safras (De Rosso & Mercadante, 2005; De Rosso *et al.*, 2008a), em camu-camu coletado em duas regiões do Estado de São Paulo (Zanatta *et al.*, 2005; Zanatta & Mercadante, 2007) e em frutos de dovyalis e tamarillo (De Rosso & Mercadante, 2007).

Quadro 1. Composição de carotenoides e/ou antocianinas de algumas frutas das famílias MORACEAE, MYRTACEAE e ROSACEAE

	Frutas	Carotenoides principais ^a	Referências	Antocianinas principais ^b	Referências
MORACEAE	Figo (<i>F. tinctora</i>)	zeaxantina (14,2) luteína (5,9)	Englberger <i>et al.</i> (2006)	n.d.	-
	Figo (<i>F. carica</i>)	n.d.	-	cyd 3-rut (55-81) cyd 3-glu (8-18)	Dueñas <i>et al.</i> (2008)
MYRTACEAE	Baguaçu (<i>E. umbelliflora</i>)	n.d.	-	mvd 3-glu (26) ptd 3-glu (26) pnd 3-glu (23)	Kuskoski <i>et al.</i> (2003)
	Camu-camu (<i>M. dubia</i>)	luteína (1,6-6,0) β -caroteno (0,7-1,4)	Zanatta & Mercadante (2007)	cyd 3-glu (88-90) dpd 3-glu (4-5)	Zanatta <i>et al.</i> (2005)
	Pitanga (<i>E. uniflora</i>)	licopeno (33) rubixantina (16) β -criptoxantina (15)	Filho <i>et al.</i> (2008)	dpd 3-glu (nd) cyd 3-glu (nd)	Einbond <i>et al.</i> (2004)
ROSACEAE	Ameixa (<i>P. domestica</i>)	β -caroteno (nd) cis-violaxantina (nd)	Gross (1987)	cyd 3-rut (45) cyd 3-glu (37)	Hong & Wrolstad (1990)
	Amora preta (<i>Rubus spp.</i>)	luteína (2,7) β -caroteno (1,0)	Marinova & Ribarova (2007)	cyd 3-glu (57) cyd 3-rut (30)	Hong & Wrolstad (1990)
	Pêssego (<i>P. persica</i>)	β -criptoxantina (5,3-7,9)	Sentanin & Rodriguez-Amaya (2007)	cyd 3-glu (93-97)	Tomás-Barberán <i>et al.</i> (2001)

^a Teores expressos em $\mu\text{g/g}$; ^b Teores expressos em %; n.d.: não determinado.

cyd – cianidina, mvd – malvidina, ptd – petunidina, pnd – peonidina, dpd – delphinidina, glu- glucose, rut – rutinose.

3. Atividade antioxidante

3.1. Oxigênio singlete e radicais livres

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em relação àquelas de um substrato oxidável,

previne ou retarda significativamente o processo oxidativo, iniciado por um pró-oxidante, do substrato. Um pró-oxidante (ou espécie reativa) é uma substância que causa dano por meio de oxidação a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em vários efeitos patológicos e/ou doenças (Prior & Cao, 1999). Do ponto de vista dos alimentos, os processos oxidativos podem influenciar na qualidade nutricional e sensorial (sabor e aroma, principalmente) do alimento, refletindo na aceitabilidade por parte do consumidor, bem como na toxicidade do alimento que sofreu oxidação.

Entre os métodos desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de uma amostra biológica, estão aqueles que envolvem a inibição de espécies reativas estáveis (Rice-Evans & Miller, 1994). Na maioria dos métodos de inibição, um pró-oxidante, normalmente um radical livre estável, é inibido na presença de um antioxidante. Essa inibição é medida e relatada como capacidade antioxidante do composto empregado como antioxidante no sistema (Prior & Cao, 1999).

A geração do cátion radical de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) forma a base de um dos métodos espectrofotométricos que têm sido aplicados para medir a atividade antioxidante de diferentes sistemas (Re *et al.*, 1999), como soluções de substâncias puras (Pannala *et al.*, 2001), misturas aquosas e bebidas (Rivero-Pérez *et al.*, 2007). Um formato mais apropriado para o ensaio com radical ABTS (ABTS^{•+}) se constitui em uma técnica de descoloração em que o radical é gerado diretamente em uma forma estável antes da reação com o antioxidante a ser avaliado (Re *et al.*, 1999). A equação 1 ilustra a formação do cátion ABTS^{•+} por meio da reação com persulfato de potássio, sendo a estrutura do radical mostrada na Figura 4. O ABTS^{•+} possui máximos de absorção na região do visível nos comprimentos de onda 645 nm, 734 nm e 815 nm, além de um pico a 415 nm. A adição de antioxidantes reduz o ABTS^{•+} tornando-o incolor, em uma extensão e escala de tempo dependente da atividade e concentração do composto antioxidante, bem como da duração da reação. Assim, a extensão da descoloração do ABTS^{•+} como porcentagem de inibição é determinada como uma função da concentração e tempo e calculada em relação à

reatividade do Trolox, como um antioxidante de referência, nas mesmas condições (Re *et al.*, 1999).

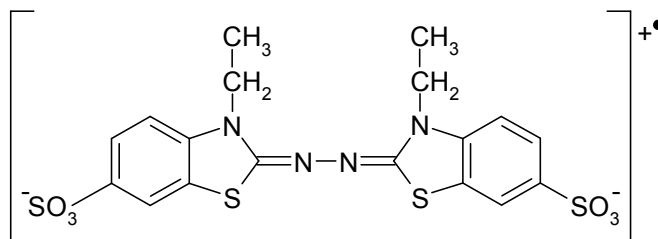
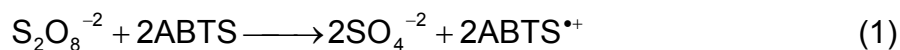


Figura 4. Estrutura molecular do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

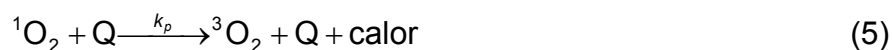
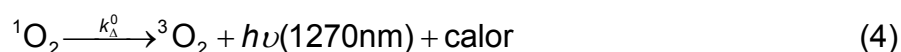
Além dos radicais livres, uma outra espécie envolvida nos processos oxidativos é o oxigênio no estado singlete, $^1\text{O}_2$, uma forma de oxigênio altamente reativa que pode ser gerada por um processo de transferência de energia a partir de um sensibilizador. Embora seja uma consequência normal do metabolismo aeróbio, a produção de $^1\text{O}_2$ em meios biológicos pode ser prejudicial se for excessiva e já foi comprovado que essa espécie é responsável pela iniciação de cadeias de oxidação nas células, causando danos tais como destruição de DNA e peroxidação lipídica (Piette, 1991; Gritti, 1990).

O $^1\text{O}_2$ pode ser produzido por processos físicos, químicos e fotoquímicos. Os métodos físicos envolvem descarga gasosa, sendo as descargas de microndas ou radiofrequências as fontes convenientes de geração de $^1\text{O}_2$ em fase gasosa. Os métodos químicos podem ser por reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito de sódio; por decomposição de adutos formados com ozônio; ou por decomposição térmica de endoperóxidos. Nos métodos fotoquímicos, um sensibilizador (S) absorve luz visível e/ou UVA, formando, a partir do estado

singlete fundamental, o estado triplete excitado (S^*) (equação 2). O sensibilizador no estado excitado, por sua vez, transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental (3O_2), produzindo 1O_2 e voltando ao seu estado fundamental S (equação 3). Entre as substâncias que atuam como sensibilizadores pode-se citar clorofila, riboflavina, azul de metileno e rosa de bengala (Choe & Min, 2006).



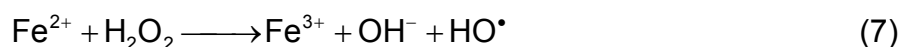
A desativação de 1O_2 em solução pode ocorrer por processos unimoleculares (fosforescência, interação com o solvente ou desativação não radioativa) ou bimoleculares por colisão com uma substância desativadora (Q). O decaimento natural de 1O_2 é determinado pelos processos de fosforescência e de interação com moléculas do solvente (equação 4), considerando que o tempo de vida natural (τ_0) da espécie 1O_2 é específico para cada solvente. O processo de desativação bimolecular pode ser por supressão física (k_p), ou por reação química (k_c), ou ambos simultaneamente (equações 5 e 6). A constante de velocidade de desativação total de 1O_2 por um composto antioxidante (k_Q) corresponde ao somatório das constantes de desativação física e química (Choe & Min, 2006; Montenegro *et al.*, 2004, 2007).



O sistema de ligações duplas conjugadas é responsável pela alta capacidade dos carotenoides de desativar 1O_2 , que é o principal mecanismo de ação antioxidante destes pigmentos, com valores de k_Q na faixa de 10^9 a 10^{10} $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ (Di Mascio *et al.*, 1989). Em geral, a atividade antioxidante dos carotenoides aumenta com o aumento do número de ligações duplas conjugadas

(Di Mascio *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1996). Os carotenoides desativam o $^1\text{O}_2$, bem como estados tripletes excitados de sensibilizadores (S^*), principalmente por supressão física, resultando no sensibilizador no estado fundamental (S) ou oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), em um processo envolvendo transferência de energia (Montenegro *et al.*, 2004; Rios *et al.*, 2007). No caso de desativação química, ocorre adição de $^1\text{O}_2$ ao carotenoide formando apo-carotenais e epóxidos, incluindo endoperóxidos (Stratton *et al.*, 1993). Além da atividade frente ao $^1\text{O}_2$, os carotenoides também são capazes de desativar radicais livres, inibindo a etapa de propagação na peroxidação lipídica.

Por outro lado, a maioria dos compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, destaca-se pela capacidade de desativar radicais livres, doando um átomo de hidrogênio ou transferindo um elétron, reações que podem ocorrer paralelamente, mas cujas velocidades podem ser diferentes. Outro mecanismo de ação antioxidante deste tipo de molécula é através da quelação de metais bivalentes capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) através da reações como a reação de Fenton (equação 7). Embora os carotenoides sejam conhecidos como os desativadores de $^1\text{O}_2$ mais eficientes, os flavonoides também apresentam uma boa capacidade de desativação de $^1\text{O}_2$ com valores de k_Q na faixa de 10^5 a 10^8 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Nagai *et al.*, 2005; Tounaire *et al.*, 1993).



A atividade antioxidante de carotenoides e antocianinas em diferentes sistemas vem sendo estudada ao longo dos anos. Miller *et al.* (1996) compararam as atividades de diferentes carotenoides frente ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em sistema homogêneo, relatando que licopeno e β -caroteno apresentaram as melhores atividades nas condições estudadas. Montenegro *et al.* (2007) avaliaram o efeito protetor exercido por licopeno microencapsulado em goma arábica frente à foto-oxidação das vitaminas presentes em leite e obtiveram resultados positivos, embora apenas cerca de 5 % de 45 % dessa proteção tenha sido atribuída ao licopeno propriamente dito. De Rosso *et al.* (2008b) estudaram a capacidade de

diferentes antocianinas, na forma de cátion flavílium, de desativar o oxigênio singlete em sistema homogêneo, encontrando valores de k_Q que variaram entre $3 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (cianiadina 3-galactosídeo) e $6 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (malvidina). Esses estudos demonstram que tanto carotenoides como antocianinas apresentam, de uma forma geral, boa capacidade antioxidante. No entanto, os resultados obtidos em estudos de atividade antioxidante podem variar em função das condições em que o trabalho é desenvolvido, sendo importante considerar que fatores tais como tipo de sistema (sistema homogêneo, emulsão, membrana, ocorrência de compartimentalização), espécie reativa utilizada, método de acompanhamento da oxidação, tipo de composto utilizado como alvo da oxidação, entre outros, podem influenciar no resultado obtido.

3.2. Lipossomas

Os lipossomas ou vesículas lipídicas são agregados formados a partir de dispersões aquosas de moléculas anfifílicas, tais como lipídios polares, que tendem a produzir estruturas bimoleculares. Essas partículas geralmente apresentam forma esférica e podem conter uma camada simples ou múltiplas camadas de membranas (Lasic, 1998).

Os lipossomas que contêm apenas uma camada de membrana bimolecular são chamados de vesículas unilamelares pequenas ($< 30 \text{ nm}$) ou grandes ($30\text{-}100 \text{ nm}$), cujas abreviaturas em inglês são SUV (small unilamellar vesicle) e LUV (large unilamellar vesicle), respectivamente. Os lipossomas que contêm mais de uma camada de membrana bimolecular são chamados vesículas multilamelares (MLV – multilamellar vesicle) se todas as camadas são concêntricas, ou multivesiculares (MVV – multivesicular vesicle) nos casos em que algumas vesículas de tamanhos aleatórios são englobadas no interior de uma outra vesícula (Taylor *et al.*, 2005).

O interior dos lipossomas consiste em uma solução aquosa com a mesma composição química do meio no qual os lipossomas foram formados, uma vez que as frações polares das moléculas de lipídio que constituem a membrana se orientam para as superfícies interna e externa da membrana, mantendo as

cadeias hidrofóbicas desses lipídios no interior da membrana (Figura 5). Quimicamente, os lipossomas são constituídos essencialmente por fosfolipídios, embora outros lipídios como galactolipídios possam ser incorporados. O fosfolipídio mais abundante é a fosfatidilcolina, ou lecitina como também é conhecida, a qual se constitui em uma molécula de glicerol contendo dois ácidos graxos (parte hidrofóbica da molécula) e um fosfato ligado a um grupo colina (parte hidrofílica) (Taylor *et al.*, 2005).

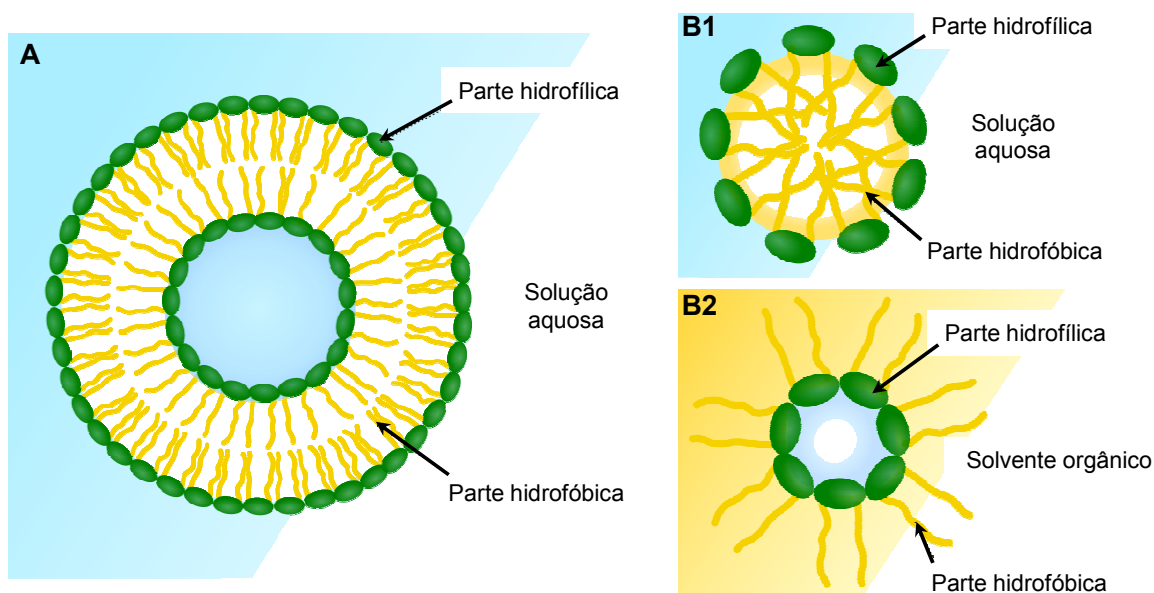


Figura 5. Estruturas da membrana bimolecular de lipossomas (A) e de micelas (B1 e B2).

Em contraste com outros agregados de surfactantes como micelas, os lipossomas não se formam espontaneamente em meio aquoso, portanto, a sua formação requer energia, a qual é maior ou menor conforme o tipo de lipossoma a ser produzido. Vesículas multilamelares (MLV) são facilmente formadas quando lipídios polares capazes de formar camadas bimoleculares são dispersos em meio aquoso sob agitação moderada. Por outro lado, para produzir vesículas

unilamelares a partir de MLVs é necessário o fornecimento de energia suficiente para romper a estrutura da vesícula multilamelar e forçar a formação de vesículas unimodais (com uma camada de membrana bimolecular). As técnicas mais comumente aplicadas são baseadas no fornecimento de energia mecânica, como, por exemplo, extrusão por membrana, agitação por ultrassom de alta intensidade e homogeneização a alta pressão (Lasic, 1998; Taylor *et al.*, 2005).

Na extrusão por membrana, a fase dispersa contendo lipossomas grandes (MLV) é forçada a passar através de uma membrana ou filtro com uma distribuição uniforme de tamanho de poro, geralmente em torno de 100 nm, produzindo um grupo homogêneo de vesículas menores unilamelares. Isto se deve a que a passagem forçada através dos poros do filtro exerce forças de cisalhamento que causam ruptura das membranas dos lipossomas, seguido por um rápido rearranjo em vesículas menores. O processo de extrusão é influenciado pela temperatura, tamanho dos poros da membrana usada para filtrar e pressão aplicada durante o processo. Para que a extrusão seja bem sucedida é recomendado que o processo seja realizado acima da temperatura de transição gel-cristal líquido dos lipídios usados na produção dos lipossomas. O tamanho dos lipossomas é menor quanto menor forem os poros da membrana usada no filtro e quanto maior a pressão aplicada durante o processo (Hunter & Frisken, 1998; Taylor *et al.*, 2005).

A estrutura em bicamada semelhante à fração lipídica de membranas celulares tem estimulado o uso de lipossomas como sistemas mimetizadores de membrana para avaliar a proteção conferida a um substrato por um antioxidante. O uso desse sistema como método para avaliação de propriedades antioxidantes permite a avaliação tanto de compostos lipofílicos, presentes na membrana, como hidrofílicos, presentes na fase aquosa dos lipossomas (Roberts & Gordon, 2003).

Os lipossomas podem ser empregados para avaliar o efeito protetor de um antioxidante tanto sobre a oxidação lipídica, como sobre a oxidação de proteínas. Para isso utiliza-se uma proteína, como a lactoalbumina, por exemplo, junto com o lipídio polar, no preparo do sistema de membranas. Métodos que se baseiam na perda de fluorescência do triptofano ou na formação de grupos carbonila na

proteína podem ser utilizados para acompanhar a oxidação proteica (Viljanen *et al.*, 2004a,b).

Cantrell *et al.* (2003) avaliaram a capacidade de desativação de oxigênio singlete por padrões de carotenoides incorporados em lipossomas unilamelares, sendo que as maiores constantes de desativação foram obtidas para β -caroteno e licopeno (23 a $24 \times 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) e a menor para luteína ($1,1 \times 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$). Em um estudo sobre o efeito protetor de diversos compostos antioxidantes sobre a oxidação lipídica iniciada por radicais livres em lipossomas, utilizando trolox como antioxidante de referência, Zhang *et al.* (2006) relataram que a quercetina e o ácido cafeico foram os compostos fenólicos com maior atividade antioxidante (TEAC de 4,3 e 3,9, respectivamente), o α -tocoferol foi 1,7 vezes mais efetivo que o trolox, e o β -caroteno foi o composto que apresentou menor atividade (TEAC não relatado). Em ambos os trabalhos (Cantrell *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), os autores relataram que a atividade antioxidante foi influenciada pela formação de agregados entre as moléculas de alguns antioxidantes e pela forma de interação dos compostos com a membrana (localização e/ou posição relativa das moléculas no sistema, distribuição dos compostos entre as fases aquosa e lipídica, mobilidade de compostos hidrofóbicos no interior da membrana, alteração das propriedades físicas da membrana pela presença de compostos hidrofóbicos).

No trabalho relatado por Viljanen *et al.* (2004a), antocianinas isoladas de frutas, contendo misturas de glicosídeos de delphinidina, cianidina e petunidina, incorporadas em lipossomas contendo lactoalbumina, preparados por meio de ultrassom com solução tampão pH 6,6, apresentaram inibição de 27-54 % na formação de dienos conjugados e 84-99 % na formação de hexanal após 6 dias de oxidação induzida por cobre a 37 °C. Em outro trabalho do mesmo grupo, utilizando o mesmo sistema para avaliação de padrões de antocianinas, as maiores porcentagens de inibição foram obtidas para pelargonidina e derivados glicosilados de cianidina, com inibições nas faixas de 77-83 % e 97-98 % para dienos conjugados e hexanal, respectivamente, para 10 $\mu\text{mol/L}$ de antocianina incorporada nos lipossomas (Viljanen *et al.*, 2004b).

Em lipossomas previamente preparados, por meio de ultrassom, com solução tampão pH 7,4, a adição de 50 $\mu\text{mol/L}$ de cianidina ou cianidina 3-glucosídeo reduziu em 30 e 34 %, respectivamente, a formação de malondialdeído (determinado por HPLC) induzida por dihidroclorato de α,α' -azodiisobutiramidina (AAPH) a 37 °C (Tsuda *et al.*, 1994). A mesma concentração de cianidina (50 $\mu\text{mol/L}$) adicionada ao mesmo tipo de lipossomas (obtido por ultrassom, pH 7,4), submetidos a oxidação induzida por cobre a 37 °C, inibiu em 85 % a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Hassimotto *et al.*, 2005).

Hassimotto *et al.* (2005) também utilizaram esse sistema (lipossomas previamente preparados, por meio de ultrassom, em pH 7,4, submetidos a oxidação induzida por cobre a 37 °C) para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais. Esses autores relataram que as amostras ricas em antocianinas, entre elas acerola, açaí, amora, jambolão, alface roxa, repolho roxo e feijão preto, apresentaram as maiores porcentagens de inibição da oxidação lipídica, com valores da ordem de 90 %, chegando a 100 % de inibição no caso do feijão preto.

O uso de lipossomas em estudos de atividade antioxidante permite a avaliação da oxidação de diferentes maneiras utilizando um mesmo sistema, por meio de ajustes no método empregado. Por exemplo, de acordo com o iniciador da oxidação escolhido, pode-se avaliar o efeito de um antioxidante sobre a oxidação iniciada por radicais livres ou por oxigênio singlete. A incorporação de uma proteína na membrana lipídica permite a avaliar o efeito sobre a oxidação de proteínas, além da oxidação lipídica. Compostos hidrofílicos e hidrofóbicos podem ser incorporados simultaneamente ao sistema para avaliação do efeito combinado de antioxidantes.

4. Microencapsulação de pigmentos

A microencapsulação é definida como um processo no qual partículas muito pequenas ou gotículas são recobertas por um revestimento, ou são embebidas em uma matriz homogênea ou heterogênea, obtendo-se pequenas cápsulas. A microencapsulação provê uma barreira física entre o composto encapsulado e os demais componentes do meio (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O material que é recoberto, que pode ser um líquido (como na maioria dos casos), um sólido ou um gás, pode ser referido por vários termos, tais como material de recheio, composto ativo, fase interna, entre outros. O material que forma o recobrimento pode ser denominado como material de parede, membrana, carreador, revestimento, entre outros (Risch, 1995).

Na área de alimentos, o recheio pode ser composto por um ou por vários ingredientes e a parede da microcápsula pode ser constituída por uma camada simples ou dupla. Na prática, o recheio pode ser um material cristalino, uma partícula adsorvente, uma emulsão, uma suspensão de sólidos, ou uma suspensão de microcápsulas menores (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A escolha do material de parede depende das propriedades físicas e químicas do composto a ser encapsulado, do processo a ser empregado para obter as microcápsulas e das propriedades finais desejadas para as microcápsulas. O material de parede deve possuir solubilidade diferente daquela apresentada pelo recheio e não deve reagir com o mesmo. Em geral, polímeros insolúveis em água são utilizados para encapsular materiais hidrossolúveis, e o inverso para compostos lipossolúveis (Jackson & Lee, 1991). No entanto, dependendo da aplicação, podem existir casos em que seja necessário o uso de ambas as fases (interna e externa) com a mesma polaridade (ou solubilidade).

A encapsulação pode ser usada para diferentes finalidades, que variam também com a área em que esse processo é empregado. Dentro da área de alimentos, a encapsulação pode ser empregada, por exemplo, para aumentar a

estabilidade de um ingrediente ou aditivo, facilitar o seu manuseio e/ou transporte (por exemplo, fazendo com que um ingrediente líquido passe a se comportar como um sólido), permitir que um ingrediente ou aditivo tenha uma liberação controlada no meio onde é adicionado, facilitar a dispersão no meio, isolar um composto do restante dos componentes do meio, alterar propriedades de superfície de materiais, reduzir a volatilidade de líquidos, e mascarar o gosto de um determinado composto (Jackson & Lee, 1991; Risch, 1995; Shahidi & Han, 1993).

Características como forma e tamanho das microcápsulas dependem do material e métodos empregados no preparo das mesmas. Os diferentes tipos de microcápsulas são produzidos a partir de uma ampla faixa de materiais de parede e por meio de diferentes processos, tais como *spray-drying*, extrusão, *spray-cooling*, coacervação, gelificação, entre outros (Desai & Park, 2005; Shahidi & Han, 1993). A seleção do método depende de aspectos econômicos, sensibilidade do recheio, tamanho de microcápsula desejado, propriedades físico-químicas tanto do recheio como do material de parede, aplicação das microcápsulas e mecanismo de liberação (Jackson & Lee, 1991).

O método de *spray-drying* é a tecnologia mais comum na microencapsulação de ingredientes alimentícios, devido ao baixo custo de produção e à disponibilidade do equipamento (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Risch, 1995). De forma geral, o preparo de microcápsulas por *spray-dryer* consiste em obter uma solução ou suspensão do material de parede, geralmente goma e/ou proteína, em água e adicionar nesse meio o material de recheio. A mistura, então, é homogeneizada e seca em secador do tipo *spray-dryer*, obtendo-se um material em pó como produto final. A homogeneização tem o objetivo de promover uma emulsão e em geral quanto menores as partículas da emulsão, maior é a retenção de recheio durante a secagem, ou seja, maior a eficiência de encapsulação.

Os carboidratos, tais como a maltodextrina e a goma arábica, estão entre os materiais de parede mais comumente utilizados na microencapsulação por *spray-dryer*. A maltodextrina, que é um carboidrato obtido a partir de hidrólise parcial do amido, provê boa estabilidade oxidativa para óleos encapsulados, por

exemplo. No entanto, esse material possui baixa capacidade emulsificante, produzindo uma emulsão pouco estável e causando uma baixa retenção de materiais de recheio hidrofóbicos (Kenyon, 1995). Por outro lado, a goma arábica, obtida por exsudação de espécies do gênero *Acacia*, apresenta excelentes propriedades emulsificantes. Essa característica da goma arábica é atribuída à presença em sua estrutura de cerca de 2 % de proteína (Dickinson, 2003). A goma arábica é um dos polímeros mais empregados como material de parede na microencapsulação por *spray-dryer*.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados para avaliar microcápsulas de carotenoides obtidas por *spray-dryer* com diferentes materiais de parede. Desobry *et al.* (1997) compararam diferentes métodos de microencapsulação de β -caroteno, avaliando a estabilidade do carotenoide microencapsulado nas diferentes condições. Barbosa *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade frente à luz de bixina encapsulada em diferentes combinações de polissacarídeos. De uma forma geral, a estabilidade do carotenoide microencapsulado, nesses trabalhos, foi maior do que aquela apresentada pelo composto não encapsulado, sendo influenciada ainda pelo método de microencapsulação e pelo tipo de material de parede empregado no preparo das microcápsulas.

Em outro tipo de estudo, microcápsulas de β -caroteno preparadas com diferentes polissacarídeos como material de parede apresentaram diferentes características físico-químicas. As microcápsulas preparadas com o amido modificado de tapioca apresentaram maior eficiência de microencapsulação e tamanho médio de partícula menor quando comparadas às preparadas com o amido de tapioca nativo ou com maltodextrina, enquanto as microcápsulas preparadas com maltodextrina apresentaram a maior solubilidade em água (a temperatura ambiente) e a distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (Loksuwan, 2007).

Esses estudos demonstraram a importância da escolha do material de parede a ser utilizado no preparo de microcápsulas que deve ser feita de acordo

com as propriedades físico-químicas desejadas para as microcápsulas, o objetivo principal da microencapsulação, assim como a aplicação que se pretende para o material encapsulado.

5. Referências Bibliográficas

- Ancos, B.; Gonzalez, E.; Cano, M.P. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208, 33-38, 1999.
- Assunção, R.B.; Mercadante, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81, 495-502, 2003.
- Barbosa, M.I.M.J.; Borsarelli, C.D.; Mercadante, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38, 989-994, 2005.
- Beekwilder, J.; Jonker, H.; Meesters, P.; Hall, R.D.; Van Der Meer, I.M.; De Vos, C.H.R. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3313-3320, 2005.
- Breithaupt, D.; Bamedi, A.; Wirt, U. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 132, 721-728, 2002.
- Brito, E.S.; Araújo, M.C.P.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9389-9394, 2007.

-
- Britton G. *Overview of carotenoid biosynthesis*. In *Carotenoids*, Vol. 3: Biosynthesis and metabolism. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhäuser, Basel, p.13-147, 1998.
- Britton, G. *UV/visible Spectroscopy*. In: *Carotenoids*, Vol 1B: Spectroscopy. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhauser, Basel, p.13-62, 1995.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel, 563p., 2004.
- Brouillard, R. *Chemical Structure of Anthocyanins*. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P. (Ed.). Academic Press Inc., New York, p.1-39, 1982.
- Caballero-Ortega, H.; Pereda-Miranda, R.; Abdullaev, F.I. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry*, 100, 1126-1131, 2007.
- Cantrell, A.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G.; Rancan, F.; Böhm, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 47-54, 2003.
- Cecchi, H.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *Journal of Food Science*, 46, 147-149, 1981.
- Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R.E. Anthocyanins and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *Journal of Food Science*, 69, 73-83, 2004.
- Chandrika, U.G.; Jansz, E.R.; Warnasuriya, N.D. Analysis of carotenoids in ripe jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) kernel and study of their bioconversion in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 186-190, 2005.
- Choe, E.; Min, D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 1-22, 2006.

-
- Collera-Zúñiga, O.; Jiménez, F.G.; Gordillo, R.M. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annum* L. *Food Chemistry*, 90, 109-114, 2005.
- Cordenunsi, B.R.; Do Nascimento, J.R.O.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2581-2586, 2002.
- De Rosso, V.V.; Hillebrand, S.; Montilla, E. C.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 291-299, 2008a.
- De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. *Food Research International*, 38, 1073-1077, 2005.
- De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9135-9141, 2007.
- De Rosso, V.V.; Vieyra, F.E.M.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radical Research*, 42, 885-891, 2008b.
- Desai, K.G.H.; Park, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394, 2005.
- Desobry, S.A.; Netto, F.M.; Labuza, T.P. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, 1158-1162, 1997.

- Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274, 532-538, 1989.
- Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39, 2003.
- Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M.J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2140-2145, 2005.
- Dueñas, M.; Pérez-Alonso, J.J.; Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailón, T. Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 107-115, 2008.
- Einbond, L.S.; Reynertson, K.A.; Xiao-DongLuo; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84, 23-28, 2004.
- Englberger, L.; Aalbersberg, W.; Dolodolotawake, U.; Schierle, J.; Humphries, J.; Iuta, T.; Marks, G.C.; Fitzgerald, M.H.; Rimon, B.; Kaiririete, M. Carotenoid content of pandanus fruit cultivars and other foods of the Republic of Kiribati. *Public Health Nutrition*, 9, 631-643, 2006.
- Filho, G.L.; De Rosso, V.V.; Meireles, M.A.A.; Rosa, P.T.V.; Oliveira, A.L.; Mercadante, A.Z.; Cabral, F.A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 33-39, 2008.
- Fraser, P.D.; Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43, 228-265, 2004.
- Furtado, P.; Figueiredo, P.; Neves, H.C.das; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 75, 113-118, 1993.

-
- Gallori, S. ; Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Barbosa, W.L.R.; Vincieri, F.F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (*açaí palm*). *Chromatographia*, 59, 739-743, 2004.
- Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121, 2007.
- Giritti, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochemistry and Photobiology*, 51, 497-509, 1990.
- Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 45, 336-339, 1995.
- Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of commercial mangoes from Brazil. *Lebensmittel Wissenschaft u-Technologie*, 22, 100-103, 1989.
- Gross, J. *Pigments in Fruits*. Academic Press, London, p.59-258, 1987.
- Gross, J.; Gabai, M.; Lifshitz, A. Carotenoids of *Eriobotrya japonica*. *Phytochemistry*, 12, 1775-1782, 1973.
- Hamano, P.S.; Mercadante, A.Z. Composition of carotenoids from commercial products of caju (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 335-343, 2001.
- Hanamura, T.; Hagiwara, T.; Kawagishi, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 280-286, 2005.
- Hassimotto, N.M.A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935, 2005.

- Hong, V.; Wrolstad, R.E. Characterization of anthocyanin containing colorants and fruit juices by HPLC/Photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 689-708, 1990.
- Houbiers, C.; Lima, J.C.; Maçanita, A.L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of flavylum cation e copigmentation with the z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry*, 102, 3578-3585, 1998.
- Hunter, D.G.; Frisken, B.J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophysical Journal*, 74, 2996-3002, 1998.
- Iacobucci, G.; Sweeny, J.G. The chemistry of anthocyanins and related flavylum salts. *Tetrahedron*, 23, 1057-1064, 1983.
- Jackson, L.S.; Lee, K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft u-Technologie*, 24, 289-297, 1991.
- Kenyon, M.M. *Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation*. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (Eds.). ACS Symp. Ser. 590, Washington, p.42-50, 1995.
- Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Yokoyama, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebensmittel Wissenschaft u-Technologie*, 24, 415-418, 1991.
- Kon, M.; Shimba, R. Cultivar difference of carotenoids in loquat fruits. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 35, 423-429, 1988.
- Kuskoski, E.M.; Vega, J.M.; Rios, J.J.; Fett, R.; Troncoso, A.M.; Asuero, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5450-5454, 2003.

-
- Lasic, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 307-321, 1998.
- Li, L.; Adams, L.S.; Chen, S.; Killian, C.; Ahmed, A.; Seeram, N.P. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57, 826-831, 2009.
- Loksuwan, J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935, 2007.
- Marinova, D.; Ribarova, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370-374, 2007.
- Mercadante, A.Z. *Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.213-240, 2008.
- Mercadante, A.Z.; Bobbio, F.O. *Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.241-276, 2008.
- Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 128-130, 1998.
- Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Britton, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 120-123, 1997.
- Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 384, 240-242, 1996.

- Montenegro, M.A.; Nunes, I.L.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Photoprotection of vitamins in skimmed milk by an aqueous soluble lycopene-gum arabic microcapsule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 323-329, 2007.
- Montenegro, M.A.; Rios, A. de O.; Mercadante, A.Z.; Nazareno, M.A.; Borsarelli, C.D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 367-373, 2004.
- Nagai, S.; Ohara, K.; Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 4234-4240, 2005.
- Nielsen, I.L.F.; Haren, G.R.; Magnussen, E.L.; Dragsted, L.O.; Rasmussen, S.E. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography – Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5861-5866, 2003.
- Pannala, A.S.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J.; Rice-Evans, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161-1168, 2001.
- Pfister, S.; Meyer, P.; Steck, A.; Pfander, H. Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2612-2615, 1996.
- Piette, J. Biological consequence associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 11, 241-260, 1991.
- Prior, R.L.; Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1173-1181, 1999.

-
- Raffo, A.; Paoletti, F.; Antonelli, M. Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology*, 219, 360-368, 2004.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293, 1994.
- Rios, A.O.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, 74, 561-565, 2007.
- Risch, S.J. *Encapsulation: overview of uses and techniques*. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (Eds.). ACS Symp. Ser. 590, Washington, p. 2-7, 1995.
- Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P.; González-Sanjosé, M.L. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5476-5483, 2007.
- Roberts, W.G.; Gordon, M.H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1486-1493, 2003.
- Sentanin, M.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de carotenóides em mamão e pêsego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 13-19, 2007.

-
- Setiawan, B.; Sulaeman, A.; Giraud, D.W.; Driskell, J.A. Carotenoid content of selected Indonesian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 169-176, 2001.
- Shahidi, F.; Han, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547, 1993.
- Sian, N.K.; Ishak, S. Carotenoid and anthocyanins contents of papaya and pineapple: influence of blanching and predrying treatments. *Food Chemistry*, 39, 175-185, 1991.
- Silva, S.R.; Mercadante, A.Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22, 254-258, 2002.
- Siriwoham, T.; Wrolstad, R.E.; Finn, C.E.; Pereira, C.B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8021-8030, 2004.
- Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172-6181, 2002.
- Strack, D.; Wray, V. *The Anthocyanins*. In: *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall/CRC, New York, p.1-22, 1994.
- Stratton, S.P.; Schaefer, W.H.; Liebler, D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. *Chemical Research in Toxicology*, 6, 542-547, 1993.
- Taylor, T.M.; Davidson, P.M.; Bruce, B.D.; Weiss, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587-605, 2005.

- Tee, E.S.; Lim, C.L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. *Food Chemistry*, 41, 309-339, 1991.
- Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I.; Cremin, P.; Waterhouse, A.L.; Hess-Pierce, B.; Kader, A.A. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4748-4760, 2001.
- Tounaire, C.; Croux, S.; Maurette, M.T.; Beck, I.; Hocquaux, M.; Braun, A.M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19, 205-215, 1993.
- Tsuda, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Norinobu, S.; Choi, S.-W.; Kawakishi, S.; Osawa, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyaniding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2407-2410, 1994.
- Veigas, J.M.; Narayan, M.S.; Laxman, P.M.; Neelwarne, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. *Food Chemistry*, 105, 619-627, 2007.
- Viljanen, K.; Kylli, P.; Kivikari, R.; Heinonen, M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7419-7424, 2004a.
- Viljanen, K.; Kivikari, R.; Heinonen, M. Protein–lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1104-1111, 2004b.
- Wu, X.; Prior, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599, 2005.

Zanatta, C.F.; Cuevas, E.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9531-9535, 2005.

Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101, 1526–1532, 2007.

Zhang, J.; Stanley, R.A.; Melton, L.D. Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membranes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 714-724, 2006.

CAPÍTULO II

**CULTIVAR INFLUENCE ON CAROTENOID COMPOSITION OF
LOQUATS FROM BRAZIL**

Artigo publicado na revista *Journal of Food Composition and Analysis*

(doi 10.1016/j.jfca.2008.10.014)

ABSTRACT

Cultivar, growing conditions and geographical origin are factors that influence the carotenoid composition in fruits. Considering that the loquat cultivars evaluated in this study, Centenária, Mizauto, Mizuho, Mizumo and Néctar de Cristal, were not previously investigated, the present work was carried out to determine and compare the carotenoid composition of these five loquat cultivars, by applying high-performance liquid chromatography connected to a photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS). Twenty five carotenoids were separated on a C₃₀ column, and twenty three of them were identified. All-*trans*- β -carotene (19-55 %), all-*trans*- β -cryptoxanthin (18-28 %), 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin (9-18 %) and 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin (7-10 %) were the main carotenoids. The total carotenoid content ranged from 196 μ g/100 g (cv. Néctar de Cristal) to 3020 μ g/100 g (cv. Mizumo). The carotenoid profile of cv. Néctar de Cristal was different from the other cultivars, which was in agreement with its cream pulp colour, differently from the other four cultivars with orange pulp colour. Cultivars Mizauto, Mizuho, Mizumo and Centenária showed provitamin A values between 89 and 162 μ g RAE/100 g, and can be considered good source of this provitamin.

Keywords: carotenoids, loquat, *Eriobotrya japonica*, Brazilian cultivars, provitamin A, HPLC-DAD-MS/MS.

INTRODUCTION

Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) is a fruit that belongs to the ROSACEAE family. This fruit is native to China and it has been widely cultivated for commercial purposes since the XIX century. The major worldwide producers of loquat fruits are China and Spain, with productions reaching 200,000 and 41,487 tons/year, respectively. In Brazil, the loquat production is centralized in São Paulo State, mainly in Mogi das Cruzes region, and the annual production was about 2,400 ton of fruits in 2001 (Caballero and Fernández, 2003).

The loquat cultivars are commercially classified as orange-pulped and white-pulped. In Brazil, Mizuho and Precoce de Itaquera are the cultivars with major economic importance (Ojiman *et al.*, 1999). Other cultivars that have been developed in Brazil, by the Agronomic Institute of Campinas (IAC), are Centenária (IAC 1567-420), Mizumo (IAC 1567-411), Mizauto (IAC 167-4) and Néctar de Cristal (IAC 866-7).

When fully ripe, the loquat fruits show yellow to orange colour due to the carotenoids presence. Apart from their colorant properties, the carotenoids are related to important functions and physiological actions, provitamin A activity being the most known one. In addition, a positive correlation has been observed between ingestion of vegetables and fruits containing carotenoids and prevention of several chronic-degenerative diseases, such as cancer, inflammation, cardiovascular disease, cataract, age-related macular degeneration, among others (Coyne *et al.*, 2005; Krinsky *et al.*, 2003; Stahl and Sies, 2005).

The carotenoid composition of certain plant species is influenced by genetic, agricultural and/or geographical factors, since these factors are known to affect the biosynthetic pathway of these pigments (Britton, 1998). In fact, studies with different cultivars of citrus (Dhuique-Mayer *et al.*, 2005), *Capsicum annuum* (Collera-Zúñiga *et al.*, 2005) and seabuckthorn (Raffo *et al.*, 2004), for example, showed the influence of this genetic factor on the carotenoid composition.

The carotenoid composition of some loquat cultivars was studied by other researchers. Kon and Shimba (1988) evaluated the carotenoid composition in Toi and Tanaka cultivars using thin layer chromatography (TLC). These pigments were also analyzed in cv. Golden Nugget using open column chromatography (OCC), TLC and mass spectrometry (Gross *et al.*, 1973). Godoy and Rodriguez-Amaya (1995) used OCC and TLC for the evaluation of carotenoids from an unspecified cultivar of loquat from Brazil. The carotenoids from a non-saponified extract of loquat were also determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (Breithaupt *et al.*, 2002). In all these cultivars, the major carotenoids were reported to be β -cryptoxanthin and β -carotene.

Since the carotenoid composition of the loquat cultivars evaluated in the present study, Mizauto, Mizumo, Centenária, Mizuho and Néctar de Cristal, was not previously determined, the objective of this work was to apply HPLC coupled to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS) to identify and quantify the carotenoids from different loquat cultivars.

MATERIAL AND METHODS

Material

Methanol (MeOH) and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) for HPLC were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) or from Mallinckrodt Baker (Philipsburg, USA). The other reagents were all of analytical grade from Labsynth (Diadema, Brazil). The samples and solvents were filtered through Millipore (Billerica, USA) membranes (0.22 and 0.45 μm) prior to HPLC analysis.

Standards of all-*trans*-lutein, all-*trans*- β -cryptoxanthin, all-*trans*- β -carotene, 15-*cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, and 9-*cis*- β -carotene were provided by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland), showing purity from 93 % to 99 % by HPLC-DAD.

Samples

Five loquat cultivars, cultivated and selected by the Agronomic Institute of Campinas (IAC), were analyzed: Centenária, Mizumo, Néctar de Cristal, Mizauto and Mizuho. The fruits were produced in the APTA Fruits Center (IAC), located in Jundiaí region (São Paulo State, Brazil, 23°8'S; 46°55'W; 700 m height), and they were harvested in September/2005, that is, in the spring of the Southern hemisphere. The loquat trees of each cultivar were grown in an orchard distributed in blocks. There were four blocks for each cultivar, spaced 7 x 5 m and one tree per block. The fruits were harvested at the same day, during the morning, in the medium portions of each plant tree directed toward to the main cardinal points (North, South, East and West). The harvested fruits, 1.5 kg of each cultivar, were transported to the laboratory, where they were immediately selected according to size and colour uniformity. Those fruits with apparent physical injuries were discarded, and the chosen samples were peeled, diced to 0.5-1.0 cm peaces with a stainless steel blade and immediately frozen in liquid nitrogen. The samples were kept under dark at -80 °C.

Brief description of cultivar characteristics:

Mizuho: This cultivar was derived from cv. Tanaka and cv. Kusunoki crossing. The fruits were the biggest ones (60-80 g) with yellow-orange colour and sweet-sour flavour.

Centenária (IAC 1567-420) and Mizumo (IAC 1567-411). Both cultivars were derived from cv. Mizuho and cv. Mogi crossing, accomplished by IAC. The fruits from cv. Centenária were big (60 g) with uniform soft orange colour. The loquats cv. Mizumo were also big (65 g), with round shape and orange colour. The pulp of both cultivars was soft and succulent.

Mizauto (IAC 167-4): This cultivar was derived from the Mizuho self-fertilization, which was also accomplished by IAC. The fruits were big (60 g) with orange colour, succulent with sweet-sour flavour pulp.

Néctar de Cristal (IAC 866-7): This cultivar was developed by IAC and it was derived from the free pollination of the Togoshi cultivar, originated in Japan. The fruits had moderate size (30-40 g), round shape and yellow colour. Differently to the other IAC-Brazilian cultivars, the pulp of this cultivar was soft cream.

Carotenoid Extraction

Before extraction, all pieces of each sample were homogenized, obtaining a unique pulp of each cultivar, from which two samples of 10-15 g were weighted and taken for extraction. The carotenoids were exhaustively extracted from the loquat pulps with acetone, transferred to petroleum ether (30-70 °C)/diethyl ether (2:1) and saponified overnight at room temperature with 10 % methanolic KOH. Alkali was removed by washing with water, and then the solvent was evaporated in a rotary evaporator (T < 40 °C).

In order to confirm that extraction was exhaustive, after six extractions, the sample was extracted again, filtered and the absence of carotenoids in the last extract was verified at 450 nm, using an Agilent spectrophotometer, model 8453 (Santa Clara, USA).

The extracts were dried and stored under dark and nitrogen atmosphere (99.9 % purity) at -35 °C until the HPLC analysis. In order to avoid the carotenoid degradation during analyses, the manipulation of samples and extracts was carried out in a dark ambient and at controlled room temperature of 22 °C.

HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS/MS Analysis

The quantitative analysis was carried out in a Waters (Milford, USA) HPLC equipped with quaternary pumps (model 600), on line degasser, a Rheodyne injection valve (Rheodyne LCC, Rohnert Park, USA) with a 20 µL loop, an external oven with temperature control and a photo-diode array detector (DAD) (Waters, model 996). Data acquisition and processing were done with the Millennium Waters software. The UV-visible spectra were obtained between 250 e 650 nm and the chromatograms were processed at 450, 350 and 280 nm.

For the MS analysis, a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) equipped with quaternary pumps (model LC-20AD), on line degasser and a Rheodyne injection valve with a 20 μ L loop was used. The equipment included, connected in series, a DAD detector (Shimadzu, model SPD-M20A) and a mass spectrometer with APCI ionization source and an ion-trap analyzer from Bruker Daltonics, model Esquire 4000 (Bremen, Germany). The MS parameters were set as follows: positive mode, current corona: 4000 nA, source temperature: 450 °C, dry gas N₂ – temperature: 350 °C, flow: 5 L/min, nebulizer: 60 psi, MS/MS fragmentation energy: 1.4 V. The mass spectra were acquired with scan range of m/z from 100 to 700 (De Rosso and Mercadante, 2007a).

In both Waters and Shimadzu HPLC equipments, carotenoid separation was carried out on a C₃₀ YMC column (5 μ m, 250 x 4.6 mm i.d.) using as mobile phase a linear gradient of MeOH with 0.1 % triethylamine (TEA)/MTBE from 95:5 to 70:30 in 30 min, following to 50:50 in 20 min. The flow rate was 1.0 mL/min and column temperature was set at 29 °C when the analysis was carried out in the Waters HPLC. TEA was added to the mobile phase since recovery on a C₃₀ column enhanced 26 % for lutein, 42 % for zeaxanthin, 55 % for β -cryptoxanthin and 64 % for β -carotene (Emenhiser *et al.*, 1996). On the other hand, TEA was excluded from the mobile phase, the flow rate and temperature were, respectively, decreased to 0.9 mL/min and 22 °C when analysis was carried out by the MS detector because TEA shows high proton affinity, being more easily ionized in the APCI source, and as a result the carotenoid ion signals decreased (De Rosso and Mercadante, 2007a)

The combined results of the following parameters were considered for carotenoid identification: elution order on the C₃₀ column, UV/visible spectrum features (maximum absorption wavelength (λ_{max}), spectral fine structure (%III/II) and peak *cis* intensity (%A_B/A_{II})), and MS spectrum characteristics as compared to standards analyzed in the same conditions and data available in the literature (Back and Enzell, 1995; Britton, 1995; De Rosso and Mercadante, 2007a and 2007b; Britton *et al.*, 2004).

The carotenoids were quantified by HPLC, using external calibration curves for all-*trans*-lutein (0.9-15.7 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0.998$), all-*trans*- β -cryptoxanthin (1.1-40.8 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0.988$) and all-*trans*- β -carotene (2.0-40.9 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0.997$). Neoxanthin, violaxanthin and neochrome were estimated using the curve of lutein, the β -cryptoxanthin epoxides using the curve of β -cryptoxanthin and the *cis*-isomers of β -cryptoxanthin and β -carotene were estimated using the curve of the corresponding all-*trans* isomer. The NAS-IOM (2001) conversion factor was used to calculate the vitamin A value, with 12 μg of dietary all-*trans*- β -carotene and 24 μg of other dietary provitamin A carotenoids corresponding to 1 μg of retinol activity equivalent (RAE), and the activities used were 100 % for all-*trans*- β -carotene, 50 % for all-*trans*- β -cryptoxanthin (Bauerfeind, 1972) and for all *cis* isomers of β -cryptoxanthin and of β -carotene.

The precision of the analysis was evaluated by the coefficient of variation (CV) among extractions. The CV values of the major carotenoids ranged from 0.0 % to 10.0 % for all-*trans*- β -carotene, from 3.0 % to 6.1 % for all-*trans*- β -cryptoxanthin and from 1.0 % to 10.7 % for 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin. These values were lower than those reported for major carotenoids from citrus fruits – 3-20 % – analyzed on a C_{30} column (Fanciullino *et al.*, 2006) and for mixed vegetable reference material – 3-30 % – analyzed on a C_{18} column (Scott *et al.*, 1996). In addition, these CV values were in the same range of those found for major carotenoids from fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus – 1-9 % (Inbaraj *et al.*, 2008) and from the alga *Dunaliella salina* – 7-8 % (Hu *et al.*, 2008), both analyzed on a C_{30} column, and for other mixed vegetable reference material – 5-12 % – analyzed on a C_{18} column (Hart and Scott, 1995). As expected, the CV values observed for minor *cis* isomers of β -carotene and β -cryptoxanthin were higher as compared to the respective *trans*, ranging from 2.9 % to 19.2 %.

Statistical Analysis

To evaluate the differences in the carotenoid concentrations and vitamin A values between the cultivars, analyses of variance were conducted using one-way ANOVA (Software Origin 7.5), with Tukey test for mean differences at $P < 0.05$.

RESULTS and DISCUSSION

Carotenoid Identification

Figures 1 and 2 show the chromatograms obtained by HPLC on a C_{30} column from Néctar de Cristal and Mizauto cultivars, respectively. The carotenoid profiles of Centenária, Mizuho and Mizumo cultivars were similar to that of cultivar Mizauto. The carotenoid structures are illustrated in Figure 3.

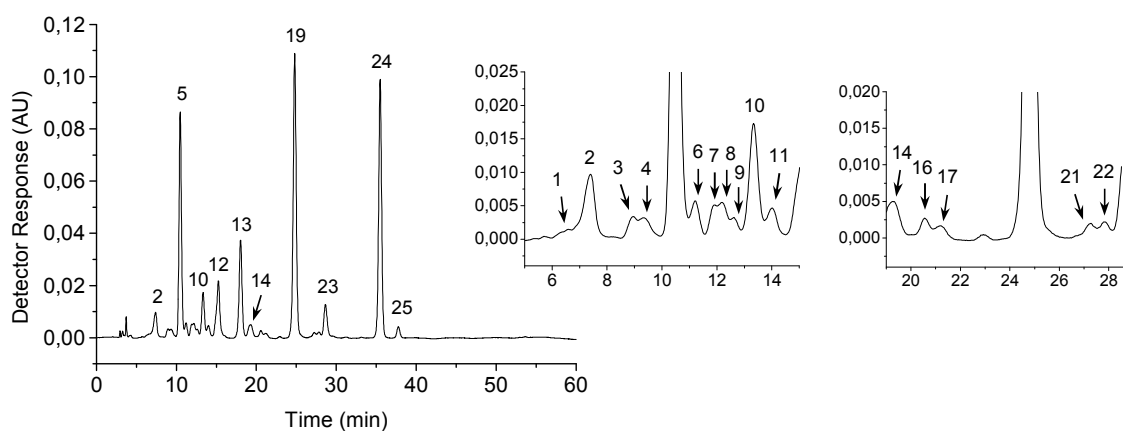


Figure 1 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from Néctar de Cristal cultivar. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm.

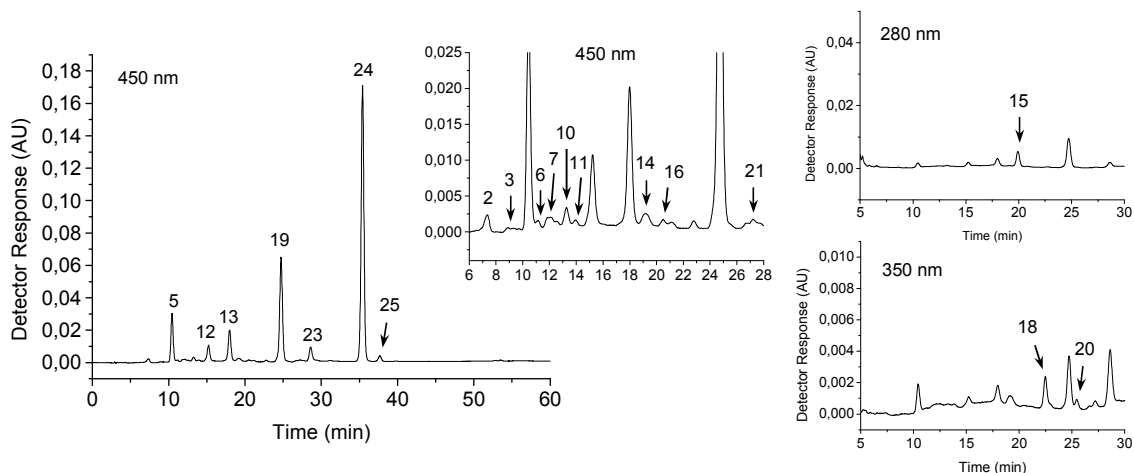


Figure 2 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from Mizauto cultivar. Chromatographic conditions: see text.

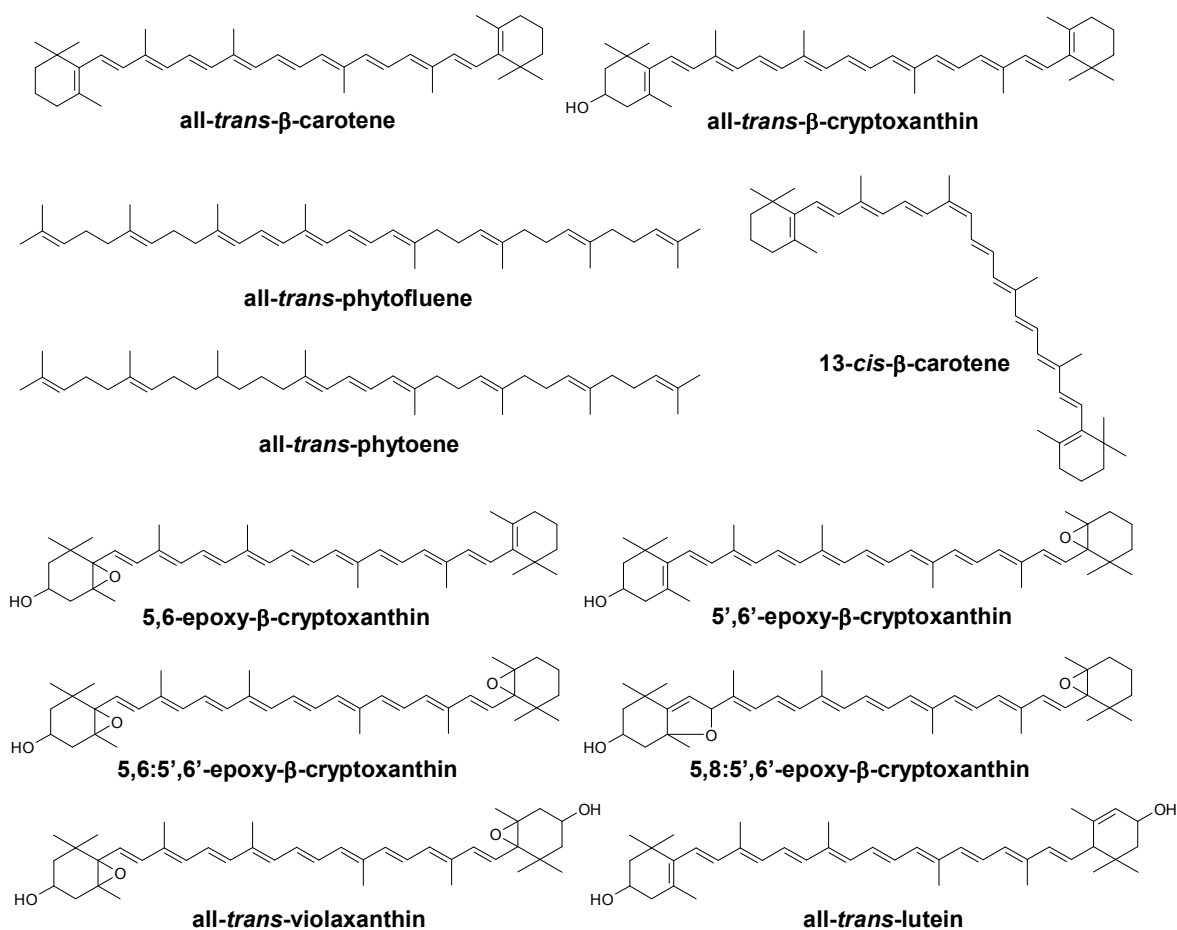


Figure 3 Structures of some carotenoids detected in loquat.

The carotenoids separated in the five loquat cultivars analyzed in the present study were identified based on the combined information obtained from chromatographic elution, UV/visible and mass spectra characteristics (Table 1). The MS/MS experiments confirmed the assignment of the protonated molecule ($[M+H]^+$) of all identified peaks, since expected fragments from both polyene chain and functional groups were obtained when the protonated molecule was further ionized (Table 1). Although in-source fragmentation occurred in the APCI interface, the second order MS unambiguously allowed the assignments of some functional groups due to the specific losses from the protonated molecule. Since a detailed description of carotenoid identification using the above information was already reported by De Rosso and Mercadante (2007a,b), only considerations regarding the carotenoids not identified in these previous reports were discussed below.

The carotenoids with at least two hydroxyl groups in the structure, *all-trans*-neoxanthin (peak 1), *9-cis*-neoxanthin + *all-trans*-violaxanthin (peak 2), *all-trans*-neochrome (peak 3), *9-cis*-violaxanthin (peak 6) and *all-trans*-lutein (peak 10), showed UV-Vis and mass spectra features similar to data reported in the literature (De Rosso and Mercadante, 2007a; Britton *et al.*, 2004). The presence of two carotenoids coeluting in peak 2 was verified by injecting carotenoid extracts from kale and mango, containing respectively *9-cis*-neoxanthin (Strand *et al.*, 2000) and *all-trans*-violaxanthin (Mercadante *et al.*, 1997; Ornelas-Paz *et al.*, 2007; Pott *et al.*, 2003). The location of the *cis* double in *9-cis*-violaxanthin (peak 6) was assigned by comparison of the UV-Vis spectrum characteristics with those described by Meléndez-Martínez *et al.* (2007) in a study involving many violaxanthin isomers. These xanthophylls were found in all five loquat cultivars, with exception of *all-trans*-neoxanthin which was detected only in cv. Néctar de Cristal.

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from loquat cultivars, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.

Peak ^a	Carotenoid	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	%III/II	%A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragment ions (m/z)
1	all- <i>trans</i> -neoxanthin	6.4	415, 440, 469	97	0	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 393, 221
2	all- <i>trans</i> -violaxanthin + 9- <i>cis</i> -neoxanthin	7.4	328, 414, 440, 469	94	9	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-92] ⁺ , 221
3	all- <i>trans</i> -neochrome	8.8-9.0	397, 420, 448	100	0	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-92] ⁺ , 221
4	<i>cis</i> -5,6:5',6'-diepoxy-β-cryptoxanthin	9.3-9.4	327, 410, 432, 460	55	40	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221, 205
5	5,6:5',6'-diepoxy-β-cryptoxanthin	10.4-10.5	415, 440, 469	89	0	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221, 205
6	9- <i>cis</i> -violaxanthin	11.1-11.2	325, 410, 435, 464	87	13	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
7	5,8:5',6'- or 5,6:5',8'-diepoxy-β-cryptoxanthin	11.9-12.1	396, 422, 448	97	0	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221, 205
8	not identified 1	12.2	399, 422, 448	98	0	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 221
9	<i>cis</i> -5,8:5',6'- or <i>cis</i> -5,6:5',8'-diepoxy-β-cryptoxanthin	12.6	315, 397, 420, 448	89	35	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221, 205
10	all- <i>trans</i> -lutein	13.3	420, 445, 472	62	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 495[M+H-18-56] ⁺
11	<i>cis</i> -5,6:5',6'-diepoxy-β-cryptoxanthin	14.0	328, 410, 435, 464	78	26	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 493[M+H-92] ⁺ , 475[M+H-18-92] ⁺ , 221, 205

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from loquat cultivars, obtained by HPLC-DAD-MS/MS – continued.

12	5',6'-epoxy- β -cryptoxanthin	15.2-15.3	420, 445, 472	60	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 205
13	5,6-epoxy- β -cryptoxanthin	18.0-18.1	420, 446, 474	55	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺ , 221
14	13- or 13'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin	19.2-19.3	337, 419, 443, 470	7	50	553	535[M+H-18] ⁺
15	phytoene	19.9	272, 285, 294	0	0	545	489, 435, 395, 339[M-205] ⁺
16	5,8-epoxy- β -cryptoxanthin	20.5-20.6	404, 426, 453	54	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 221
17	not identified 2	21.2	442	0	n.c. ^d	n.d. ^e	n.d. ^e
18	<i>cis</i> -phytofluene	22.5	331, 347, 365	55	0	543	461, 406[M+H-137] ⁺ , 337[M-205] ⁺
19	all- <i>trans</i> - β -cryptoxanthin	24.7-24.8	424, 451, 477	32	0	553	535[M+H-18] ⁺ , 497[M+H-56] ⁺ , 461[M+H-92] ⁺
20	all- <i>trans</i> -phytofluene	25.4-25.5	331, 347, 365	76	0	543	461, 406[M+H-137] ⁺ , 337[M-205] ⁺
21	15- <i>cis</i> - β -carotene	27.2-27.3	335, 421, 448, 475	0	57	537	444[M-92] ⁺
22	9- or 9'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin	27.8	337, 420, 445, 472	30	15	553	535[M+H-18] ⁺ , 479[M+H-18-56] ⁺
23	13- <i>cis</i> - β -carotene	28.6	338, 420, 445, 470	11	47	537	444[M-92] ⁺
24	all- <i>trans</i> - β -carotene	35.4-35.5	425, 452, 479	27	0	537	444[M-92] ⁺
25	9- <i>cis</i> - β -carotene	37.6-37.8	337, 421, 447, 474	23	17	537	444[M-92] ⁺

^a Numbered according to Figures 1 and 2

^b Range of retention time on the C₃₀ column

^c Linear gradient of methanol/MTBE

^d n.c.: not calculated

^e n.d.: not detected

^f In-source fragments

All β -cryptoxanthin diepoxides (peaks 4, 5, 7, 9 and 11) showed the $[M+H]^+$ at m/z 585 and, as expected, identical fragmentation pattern obtained in the MS/MS experiments since it is not possible to distinguish by MS between the 5,6-epoxide and 5,8-furanoid end groups. The second order MS experiments showed successive losses of water due to elimination of hydroxyl and/or epoxide groups, elimination of toluene from the polyene chain ($[M+H-92]^+$), alone or also combined with loss of water ($[M+H-92-18]^+$). Another interesting feature was the simultaneous presence of the fragments at m/z 205 and 221, both characteristic of epoxide groups, but one located in an unsubstituted ring (m/z 205) whilst another in a ring with a hydroxyl group (m/z 221) (Back and Enzell, 1995). Therefore, the identification of these peaks was based on the UV-vis spectra characteristics. Peak 5 was identified as 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin due to 10 nm hypsochromic shift compared to the λ_{max} of β -cryptoxanthin, indicating the presence of two epoxide groups at 5,6- and 5',6'- positions (Britton, 1995; Britton *et al.*, 2004). The UV-vis spectra of peaks 4 and 11 showed 5-8 nm hypsochromic shift, presence of *cis* peak at 327-328 nm, decreased spectral fine structure and increased *cis* peak intensity as compared to that of 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin (peak 5), indicating that these carotenoids were *cis* isomers of 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin, most probably at 13- or 15- (peak 4) and 9- (peak 11) *cis* positions according to their elution order. The UV-Vis spectrum of peak 7 showed an hypsochromic shift of 28 nm as compared to β -cryptoxanthin, indicating the presence of one furanoid and one epoxide groups; however, it was not possible to distinguish between the 5,8:5',6'- or 5,6:5',8'-diepoxy- β -cryptoxanthin. Peak 9 was characterized as a *cis*-isomer of 5,8:5',6'- or 5,6:5',8'-diepoxy- β -cryptoxanthin considering its lower λ_{max} values, appearance of a *cis* peak at 315 nm, decreased spectral fine structure and increased *cis* peak intensity as compared to peak 7.

The monoepoxides of β -cryptoxanthin (peaks 12, 13 and 16) were identified considering the UV-Vis and MS characteristics discussed above and by comparison with literature data (De Rosso and Mercadante, 2007b). The 5,6-epoxide or 5,8-furanoid groups that could be located in one of the end groups of β -

cryptoxanthin (Figure 3) was assigned as 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin (peak 13) and 5,8-epoxy- β -cryptoxanthin (peak 16) due to the presence of the mass fragment at m/z 221 that corresponds to the location of the epoxide/furanoid group in the 3-hydroxy- β -ring, whereas the fragment at m/z 205 detected in peak 12 allowed its identification as 5',6'-epoxy- β -cryptoxanthin. The exact location of the epoxide group is important to the vitamin A value, since 5',6'-epoxy- β -cryptoxanthin does not have provitamin activity, whereas both 5,6- and 5,8-epoxy- β -cryptoxanthin shows 50 % activity. For example, in the case of the Mizuho cultivar, if 5',6'-epoxy- β -cryptoxanthin was identified as 5,6-epoxy, and 5,6- and 5,8-epoxy- β -cryptoxanthin were identified as 5',6'- and 5',8'-epoxy, respectively, the vitamin A value for this cultivar would be 122 μg RAE/100 g, whereas using the correct identification this value was 127 μg RAE/100 g, implying in an error of 4 %.

Among the eight epoxides and diepoxides of β -cryptoxanthin separated in loquat cultivars, six of them were found in all cultivars, whereas *cis*-5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin (peak 4) was detected only in cultivars Centenária and Néctar de Cristal, and *cis*-5,8:5',6'-(or 5,6:5',8')-diepoxy- β -cryptoxanthin was found in cultivars Mizuho and Néctar de Cristal.

The *cis* isomers of β -cryptoxanthin (peaks 14 and 22) were identified considering that the spectral fine structure ($\%III/II$) decreases and intensity of the *cis*-peak ($\%A_B/A_{II}$) increases as the *cis*-double bond is getting closer to the centre of the molecule (Zechmeister, 1944) and according to the results of those isomers formed by acid-catalyzed isomerization of β -cryptoxanthin standard (De Rosso and Mercadante, 2007b). However, it was not possible to distinguish between the 13-*cis* or 13'-*cis*- and 9-*cis* or 9'-*cis* isomers since there is no data available in the literature using nuclear magnetic resonance for exact determination of the *cis*-double bond positions in the β -cryptoxanthin structure for these compounds eluted on a C_{30} column. The 13-*cis* or 13'-*cis*- β -cryptoxanthin was found in all loquat cultivars, whilst the 9-*cis* or 9'-*cis* isomer was detected only in cv. Néctar de Cristal. Similar results for fresh and pasteurized orange juice and fresh and canned peach

samples, with detection of 13-*cis*- β -cryptoxanthin but not 9-*cis*- β -cryptoxanthin, were reported by Lessin *et al.* (1997). These results denote that the relative abundance of the *cis*-isomers of β -cryptoxanthin show a similar trend as the β -carotene ones, since the contents of 13-*cis*- β -carotene were usually higher than those of 9-*cis*-isomer in fruits (De Rosso and Mercadante, 2007a,b).

All the other carotenoids, phytoene (peak 15), *cis*-phytofluene (peak 18), all-*trans*-phytofluene (peak 20), all-*trans*- β -cryptoxanthin (peak 19), all-*trans*- β -carotene (peak 24), 9-*cis*- β -carotene (peak 25), 13-*cis*- β -carotene (peak 23) and 15-*cis*- β -carotene (peak 21) were identified by elution order on C₃₀ column, UV-Vis and mass spectra characteristics as compared to standards and to the literature (Dachtler *et al.*, 2001; De Rosso and Mercadante, 2007a,b; Ornelas-Paz *et al.*, 2007; Strohschein *et al.*, 1999). The non-coloured carotenes (peaks 15, 18, 20) were not found in cv. Néctar de Cristal.

The main carotenoids found in the present study, 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin, 5,6-epoxy- β -cryptoxanthin, all-*trans*- β -cryptoxanthin and all-*trans*- β -carotene, were previously found by Gross *et al.* (1973) in cv. Golden Nugget. In a non-specified cultivar of loquat cultivated in Brazil, all the carotenoids cited above were detected, but 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin (Godoy and Rodriguez-Amaya, 1995). In addition, all-*trans*- β -carotene was the major carotenoid in non-saponified extract of loquat, accompanied by 9-*cis*- and 13-*cis*- β -carotene, as well as by free all-*trans*- β -cryptoxanthin and its esters (Breithaupt *et al.*, 2002). On the other hand, the *cis* isomers of 5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin, 9-*cis*-violaxanthin, *cis*-5,8:5'6'(or 5,6:5',8')-diepoxy- β -cryptoxanthin, 5,8-epoxy- β -cryptoxanthin and 15-*cis*- β -carotene are being reported for first time in loquat cultivars.

Quantitative Composition

Table 2 shows the carotenoid concentrations obtained for the five loquat cultivars. In all cultivars the major carotenoids were all-*trans*- β -carotene (peak 24), varying from 19 % (cv. Néctar de Cristal) to 55 % (cv. Centenária) of the total

carotenoid content, and all-*trans*- β -cryptoxanthin (peak 19), ranging between 18 % (cv. Centenária) and 28 % (cv. Néctar de Cristal). This characteristic was already observed for all different loquat cultivars evaluated by other researchers (Breithaupt *et al.*, 2002; Godoy and Rodriguez-Amaya, 1995; Gross *et al.*, 1973; Kon and Shimba, 1988).

However, the cream pulp cv. Néctar de Cristal showed both qualitative and quantitative differences as compared to the other four cultivars with orange pulp. The total carotenoid content in this cultivar was, respectively, eight and fifteen times significantly lower than those found in cv. Centenária and cv. Mizumo. In addition, differently from the other cultivars, the all-*trans*- β -cryptoxanthin level was higher than that of all-*trans*- β -carotene in cv. Néctar. Another difference is concerned to the lutein proportion in relation to the total carotenoid content, 3.3 % in cv. Néctar de Cristal and from 0.2 % to 0.6 % in the other cultivars. These characteristics are probably because cv. Néctar de Cristal was derived from different cultivars, whereas all the other cultivars analyzed in this study, Mizuho, Centenária, Mizumo and Mizauto, had similar origins. Other loquat with whitish-yellow pulp, cv. Toi, also showed β -cryptoxanthin content higher than that of β -carotene and lutein proportion about 4.2 % (Kon and Shimba, 1988).

Despite that cv. Mizuho showed total carotenoid content significantly higher ($P < 0.05$) than that found in cv. Mizauto, the relative proportion of the major carotenoids from these cultivars were similar – 22 % and 24 % of all-*trans*- β -cryptoxanthin and 43 % and 49 % of all-*trans*- β -carotene, respectively. In fact, the all-*trans*- β -cryptoxanthin content in cv. Mizuho was significantly higher compared to the Mizauto one, but the all-*trans*- β -carotene levels were not statistically different ($P > 0.05$). These similarities can be expected since cv. Mizauto was derived from cv. Mizuho. However, cv. Tanaka whose crossing with cv. Kusunoki gave origin to cv. Mizuho, showed 3850 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of total carotenoid level, being 55 % of β -carotene (2110 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and 25 % β -cryptoxanthin (960 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) (Kon and Shimba, 1988), values higher than those found in the present study for cv. Mizuho.

Table 2 Concentration ($\mu\text{g}/100\text{g}$) of carotenoids and vitamin A values ($\mu\text{g RAE}/100\text{g}$) of loquat cultivars.

Carotenoids	cv. Centenária¹	cv. Mizauto¹	cv. Mizuho¹	cv. Mizumo¹	cv. Néctar de Cristal¹
all- <i>trans</i> -neoxanthin	not detected	not detected	not detected	not detected	0.2
all- <i>trans</i> -violaxanthin + 9- <i>cis</i> -neoxanthin	9.3 ^{ab}	12.9 ^a	22.7 ^c	28.2 ^c	4.4 ^b
all- <i>trans</i> -neochrome	0.3 ^a	1.5 ^{bc}	1.9 ^b	6.4 ^d	1.2 ^c
<i>cis</i> -5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin	3.5 ^a	not detected	not detected	not detected	1.8 ^b
5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin	161.0 ^a	180.3 ^a	339.5 ^b	324.9 ^b	35.0 ^c
9- <i>cis</i> -violaxanthin	2.4 ^a	5.4 ^b	7.1 ^b	12.8 ^c	2.3 ^a
5,8:5',6'- or 5,6:5',8'-diepoxy- β -cryptoxanthin	3.1 ^a	6.4 ^a	34.8 ^b	7.1 ^a	1.8 ^a
not identified 1	3.1 ^a	not detected	not detected	8.4 ^b	1.9 ^c
<i>cis</i> -5,8:5',6'- or 5,6:5',8'-diepoxy- β -cryptoxanthin	not detected	not detected	10.9 ^a	not detected	1.1 ^b
all- <i>trans</i> -lutein	3.9 ^a	12.5 ^b	13.5 ^b	7.9 ^c	6.4 ^c
<i>cis</i> -5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin	4.6 ^a	4.5 ^a	12.1 ^b	10.4 ^c	1.9 ^d
5',6'-epoxy- β -cryptoxanthin	40.3 ^a	67.9 ^b	104.1 ^c	109.4 ^c	11.5 ^d
5,6-epoxy- β -cryptoxanthin	102.4 ^a	137.9 ^b	213.9 ^c	207.2 ^c	19.0 ^d
13- or 13'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin	5.8 ^a	15.1 ^b	20.1 ^b	16.6 ^b	4.0 ^a
phytoene	25.3 ^a	22.0 ^b	22.1 ^b	34.0 ^c	not detected
5,8-epoxy- β -cryptoxanthin	4.6 ^a	3.8 ^a	13.1 ^b	15.3 ^b	1.6 ^a
not identified 2	not detected	not detected	not detected	not detected	1.1
<i>cis</i> -phytofluene	12.5 ^a	8.5 ^b	10.1 ^b	19.3 ^c	not detected
all- <i>trans</i> - β -cryptoxanthin	278.4 ^a	480.2 ^b	557.6 ^c	715.2 ^d	54.8 ^e
all- <i>trans</i> -phytofluene	1.7 ^a	1.9 ^a	3.3 ^b	3.4 ^b	not detected
15- <i>cis</i> - β -carotene	2.0 ^a	4.8 ^a	3.0 ^a	3.4 ^a	0.7 ^a

Table 2 Concentration ($\mu\text{g}/100\text{g}$) of carotenoids and vitamin A values ($\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$) of loquat cultivars – continued.

	not detected	not detected	not detected	not detected	not detected	not detected
9- or 9'- <i>cis</i> - β -cryptoxanthin	not detected	not detected	not detected	not detected	not detected	0.8
13- <i>cis</i> - β -carotene	19.4 ^a	42.0 ^b	45.9 ^b	36.2 ^b	5.0 ^c	5.0 ^c
all- <i>trans</i> - β -carotene	858.5 ^a	980.9 ^{ab}	1090.7 ^b	1441.5 ^c	38.1 ^d	38.1 ^d
9- <i>cis</i> - β -carotene	6.7 ^a	17.3 ^{bc}	18.0 ^b	12.3 ^c	1.6 ^a	1.6 ^a
Total Carotenoids	1548.6 ^a	2005.7 ^b	2544.4 ^c	3019.5 ^d	196.2 ^e	196.2 ^e
Vitamin A value	89.0 ^a	111.0 ^b	127.2 ^b	162.0 ^c	6.8 ^d	6.8 ^d

[†] Average and standard deviation of duplicated analysis

^{a, b, c, d, e} Different superscripts in the same row indicate mean difference at significant level of 5 %

The concentrations of all carotenoids, except *cis*-5,6:5',6'-diepoxy- β -cryptoxanthin, were significantly higher ($P < 0.05$) in cv. Mizumo as compared to those found in cv. Centenária, despite both cultivars were obtained from Mizuho and Mogi crossing. For example, cv. Mizumo showed total carotenoid and all-*trans*- β -carotene contents about two times significantly higher than those found in Centenária. Furthermore, these cultivars showed other differences, in respiratory activity, ethylene production and chemical composition, according to results not published (Hasegawa *et al.*, 2007).

The total carotenoid concentration (2000-2500 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and the β -cryptoxanthin proportion (22 %) from cv. Golden Nugget (Gross *et al.*, 1973) were in the same range of those found for Centenária, Mizauto, Mizuho and Mizumo cultivars (total carotenoid 1549-3020 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and 18-28 % of β -cryptoxanthin). In addition, the contents of total carotenoid (1760 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), β -carotene (780 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and β -cryptoxanthin (480 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) from a not specified cultivar from Brazil (Godoy and Rodriguez-Amaya, 1995) were in the same range of those found for cultivars Centenária, Mizauto and Mizuho evaluated in the present study.

Provitamin A Activity

Among the twenty three carotenoids identified, only nine of them show vitamin A activity. Table 2 shows the provitamin A values calculated for all loquat cultivars. The provitamin A values of Centenária and Mizauto cultivars were in the range of $175 \pm 12\ \mu\text{g RE}/100\text{ g}$ already reported for loquat (non-specified cultivar) also harvested in Brazil (Godoy and Rodriguez-Amaya, 1995).

Cultivars Mizauto, Mizuho and Mizumo can be considered good source of provitamin A, when compared to moderate or rich sources of this nutrient, such as mango cultivars Tommy Atkins and Keitt (48-126 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$) (Mercadante and Rodriguez-Amaya, 1998), caja (45-61 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$) (Hamano and Mercadante, 2001), cashew-apple (5-9 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$) (Assunção and Mercadante, 2003),

camu-camu (7-12 μg RAE/100 g) (Zanatta and Mercadante, 2007) and acerola cultivar Olivier (74-142 μg RAE/100 g) (De Rosso and Mercadante, 2005).

In summary, in the present study, the carotenoid composition of all loquat cultivars, as well as cultivar differences, was successfully determined by HPLC-DAD-MS/MS technique. Among the analyzed cultivars, the most significant difference was concerned to the quantitative composition of carotenoids. The vitamin A values indicated that loquat fruits, mainly those belonging to Mizauto, Mizuho, and Mizumo cultivars, represent good source of provitamin A.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Funding Agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for their financial support.

REFERENCES

- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z., 2003. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry* 81, 495-502.
- Back, S., Enzell, C.R., 1995. Mass Spectrometry. In *Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, E.) pp 261-320. Birkhäuser, Basel.
- Bauerfeind, J.C., 1972. Carotenoid vitamin A precursors and analogous in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 456-473.

-
- Breithaupt, D., Bamedi, A., Wirt, U., 2002. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative Biochemistry and Physiology B* 132, 721-728.
- Britton G., 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. In *Carotenoids, Vol. 3: Biosynthesis and metabolism* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, E.) pp 13-147. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., 1995. UV/visible spectroscopy. In *Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy* (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, E.) pp 13-62. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel.
- Caballero, P., Fernández, M.A., 2003. Loquat, production and market. In: *First International Symposium on Loquat*, pp.11-20. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza.
- Collera-Zúñiga, O., Jiménez, F.G., Gordillo, R.M., 2005. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry* 90, 109-114.
- Coyne, T., Ibiebele, T.I., Baadr, P. D., Dobson, A., McClintock, C., Dunn, S., Leonard, D., Shaw, J., 2005. Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *American Journal of Clinical Nutrition* 82, 685-693.
- Dachtler, M., Glaser, T., Kohler, K., & Albert, K., 2001. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Analytical Chemistry* 73, 667-674.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2005. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests. *Food Research International* 38, 1073-1077.

- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007a. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5062-5072.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007b. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9135-9141.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., Amiot, M.J., 2005. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2140-2145.
- Emenhiser, C., Simunovic, N., Sander, L.C., Schwartz, S.J., 1996. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C₃₀ column in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3887-3893.
- Fanciullino, A.L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R., Ollitrault, P., 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4397-4406.
- Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, D.B., 1995. Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 45, 336-339.
- Gross, J., Gabai, M., Lifshitz, A., 1973. Carotenoids of *Eriobotrya japonica*. *Phytochemistry* 12, 1775-1782.
- Hamano, P.S., Mercadante, A.Z., 2001. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 335-343.
- Hart, D.J., Scott, K.J., 1995. 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 Chemistry* 54, 101-111.
- Hasegawa, P.N., Faria, A.F., Mercadante, A.Z., Chagas, E.A., Pio, R., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R., Purgatto, E., 2009. Chemical composition of five loquat cultivars planted in Brazil. *Ciencia Tecnologia Alimentos (in press)*.
- Hu, C.C., Lin, J.T., Lu, F.J., Chou, F.P., Yang, D.J., 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry* 109, 439-446.
- Inbaraj, B.S., Lu, H., Hung, C.F., Wu, W.B., Lin, C.L., Chen, B.H., 2008. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 812-818.
- Kon, M., Shimba, R., 1988. Cultivar difference of carotenoids in loquat fruits. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 35, 423-429.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T., Bone, R.A., 2003. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition* 23, 171-201.
- Lessin, W.J., Catigani, G.L., Schwartz, S.J., 1997. Quantification of *cis-trans* isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3728-3732.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J., 2007. Geometrical isomers of violaxanthin in orange juice. *Food Chemistry* 104, 169-175.
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., 1998. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 128-130.

- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., Britton, G., 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 120-123.
- NAS-IOM, 2001. *Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. National Academy Press, Washington. pp. 92.
- Ojima, M., Campo Dall'orto, F.A., Barbosa, W., Martins, F.P., Santos, R.R., 1999. *Cultura da nespereira*. Technical Bulletin 185. Instituto Agronômico, Campinas.
- Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Gardea-Bejar, A., 2007. Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven Mexican mango cultivars by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCI⁺)-MS]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6628-6635.
- Pott, I., Breithaupt, D.E., Carle, R., 2003. Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. Kent). *Phytochemistry* 64, 825-829.
- Raffo, A., Paoletti, F., Antonelli, M., 2004. Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology* 219, 360-368.
- Scott, K.J., Finglas, P.M., Seale, R., Hart, D.J., Froidmont-Görtz, I., 1996. Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in foods. *Food Chemistry* 57, 85-90.
- Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1740, 101-107.
- Strand, A., Kvernberg, K., Karlsen, A.M., Liaaen-Jensen, S., 2000. Geometrical *E/Z* isomers of (6*R*)- and (6*S*)-neoxanthin and biological implications. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 443-455.

Strohschein, S., Pursch, M., Albert, K., 1999. Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C₃₀ stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21, 669-677.

Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z., 2007. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry* 101, 1526-1532.

Zechmeister, L., 1944. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. *Chemical Reviews* 34, 267-344.

CAPÍTULO III

CAROTENOID COMPOSITION OF JACKFRUIT (*Artocarpus heterophyllus*), DETERMINED BY HPLC-DAD-MS/MS

Artigo publicado na revista *Plant Foods for Human Nutrition*

(doi 10.1007/s11130-009-0111-6)

ABSTRACT

Carotenoids are pigments responsible for the yellow-reddish color of many foods and are related to important functions and physiological actions, preventing several chronic-degenerative diseases. The objective of this study was to confirm the carotenoid composition of jackfruit by high-performance liquid chromatography connected to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS). The main carotenoids were all-*trans*-lutein (24-44 %), all-*trans*- β -carotene (24-30 %), all-*trans*-neoxanthin (4-19 %), 9-*cis*-neoxanthin (4-9 %) and 9-*cis*-violaxanthin (4-10 %). Either qualitative or quantitative differences, mainly related to the lutein proportion, were found among three batches of jackfruit. Since the fruits from batch A showed significantly lower contents for almost all carotenoids, it also had the lowest total carotenoid content (34.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and provitamin A value, whereas the total carotenoid ranged from 127.5 to 149.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the other batches. The provitamin A values from batches B and C were 3.3 and 4.3 $\mu\text{g RAE}/100\text{ g}$, respectively. The carotenoid composition of jackfruit was successfully determined, where fourteen of the eighteen identified carotenoids were reported for first time. Differences among batches may be due to genetic and/or agricultural factors.

Keywords: carotenoids; HPLC-DAD-MS/MS; *Artocarpus heterophyllus*; jackfruit.

Introduction

Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), a plant native from India and common in Asia, Africa and South America, belongs to the MORACEAE family and grows in warm and moist regions. The fruits are big, 22 to 90 cm long with diameter reaching 13 to 50 cm and their weight ranging between 3 and 60 kg, when ripe. The pulp represents about 30 % of the jackfruit weight and, due to the carotenoids presence, shows cream color, while the external fruit color varies from soft green to yellow [1-3].

Carotenoids are a class of natural pigments responsible for the yellow-reddish color of many fruits, vegetables, animals, algae and microorganisms. Apart from their colorant properties, carotenoids are related to important functions and physiological actions, provitamin A activity being the most known one. In addition, a positive correlation has been observed between ingestion of vegetables and fruits containing carotenoids and prevention of several chronic-degenerative diseases, such as cancer, inflammation, cardiovascular disease, cataract, age-related macular degeneration, among others [4-7].

Since inconclusive or incorrect identification of carotenoids are found in the literature, it is strongly recommended to accomplish the minimum criteria for identification of these compounds [8-11]. The UV-visible (UV-Vis) spectrum (maximum absorption wavelengths (λ_{max}), spectral fine structure (%III/II) and peak *cis* intensity (% A_B/A_{II})) should be in agreement with the chromophore suggested, chromatographic properties verified in two systems or co-chromatography with authentic standard should be carried out, and a mass spectrum should be obtained, allowing at least the confirmation of the molecular mass.

According to a literature search, the major carotenoids from jackfruit were determined by open column or high performance liquid chromatography (HPLC) [12-14]. However, in these works, the above described minimum criteria were not fulfilled, that is, the carotenoid identification was solely based on elution order on the chromatographic system, UV-visible spectra characteristics and sometimes

chemical reactions. This identification procedure resulted on the identification of crocetin, among other carotenoids, in jackfruit [14]. However, up to now, crocetin and its derivatives were only found in saffron and gardenia [15,16]. Lycopene was also identified, despite the soft color of the jackfruit pulp [13].

Thus, the present study was carried out to confirm the carotenoid composition of jackfruit applying HPLC coupled to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS).

Materials and Methods

Standards

Standards of all-*trans*- isomers of lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene, along with 9-*cis*-, 13-*cis*- and 15-*cis*- β -carotene were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland), showing purity between 95 % and 99 % measured by HPLC-DAD.

Samples

Three batches of jackfruit at ripe state were acquired in a supermarket in Campinas city, São Paulo State, Brazil, during their harvest season (April of 2007). The fruits from batch A were about 30 cm long, with diameter of ~ 20 cm, and their pulp was hard with cream color. The fruits from batch B were about 35 cm long, with diameter of ~ 22 cm, while the fruits from batch C were about 40 cm long, with diameter of ~ 25 cm. The pulp of fruits from batches B and C was soft and showed a yellow color. The external color of all batches was yellow-green, but for batch A the green was more intense as compared to the other batches. The peel and seeds of the fruits, about 2 kg each batch, were manually removed, and the pulp was homogenized.

Carotenoid Extraction

The carotenoids were exhaustively extracted, in duplicate, from the jackfruit pulps (7 to 10 g) [11]. The dried extracts were stored under nitrogen atmosphere (99.9% purity) in the dark at - 35 °C until HPLC analysis. In order to avoid the carotenoid degradation during analyses, the manipulation of samples and extracts was carried out in a room with absence of light and temperature of 21 °C.

HPLC-DAD-MS/MS Analysis

The analysis was carried out in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) connected in series to a DAD detector (Shimadzu) and a mass spectrometer with an ion-trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source from Bruker Daltonics, model Esquire 4000 (Bremen, Germany). The UV-Vis spectra were obtained between 250 and 600 nm and the chromatograms were processed at 280 nm, 350 nm and 450 nm. The MS parameters were set as follows: positive mode, current corona: 4000 nA, source temperature: 450 °C, dry gas N₂ – temperature: 350 °C, flow: 5 L/min, nebulizer: 60 psi. The MS/MS experiments were set in automatic mode applying fragmentation energy of 1.4 V. The mass spectra were acquired with scan range of *m/z* from 100 to 700 [11].

Carotenoids were separated on a C₃₀ YMC column (3 μm, 250 x 4.6 mm i.d.) using as mobile phase a linear gradient of methanol (MeOH)/methyl *tert*-butyl ether (MTBE) from 95:5 to 70:30 in 30 min, following to 50:50 in 20 min. The flow rate was 0.9 mL/min and column temperature was set at 22 °C [11]. The separation was also carried out on a C₁₈ Novapak (Waters, Wilmington, USA) column (4 μm, 4.0 x 300 mm) using as mobile phase a linear gradient of acetonitrile (0.1 % triethylamine)/water/ethyl acetate from 88:10:2 to 85:0:15 in 25 min, maintaining this proportion until the end of the run, at 1 mL/min and column temperature set at 29 °C (data not shown).

The combined results of the following parameters were considered for carotenoid identification: elution order on both reversed phase columns (C₁₈ and

C₃₀), co-chromatography with standards, UV/visible spectrum features (λ_{\max} , %III/II and %A_B/A_{II}), and MS spectrum characteristics as compared to standards analyzed in the same conditions and data available in the literature [11,17-20]. In addition, the assignment of the protonated molecule ($[M+H]^+$) was confirmed by second order MS fragmentation.

The carotenoids were quantified by HPLC-DAD, using external calibration curves for lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene with a minimum of 5 concentration levels. Neoxanthin, neochrome, violaxanthin, luteoxanthin, antheraxanthin, α -cryptoxanthin and zeinoxanthin were estimated using the curve of lutein, and the *cis*-isomers of β -carotene were estimated using the curve of the corresponding all-*trans* isomer. The limit of detection (LOD) was calculated using the parameters of each standard curve, as $LOD = 3.3 \times SD/S$, where SD is the standard deviation of the response and S is the slope of the curve [21].

The NAS-IOM [22] conversion factor was used to calculate the vitamin A value, with 12 μ g of dietary all-*trans*- β -carotene and 24 μ g of other dietary provitamin A carotenoids corresponding to 1 μ g of retinol activity equivalent (RAE), and the activities used were 100 % for all-*trans*- β -carotene, 50 % for all-*trans*- β -cryptoxanthin [23] and for all *cis* isomers of β -carotene.

Statistical Analysis

To evaluate the differences in the carotenoid concentrations and vitamin A values between the cultivars, analyses of variance were conducted using one-way ANOVA (Software Origin 7.5), with Tukey test for mean differences at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Carotenoid Identification

The carotenoids separated in three jackfruit batches were identified based on the combined information obtained from chromatographic elution, UV/visible and mass spectra characteristics (Table 1). The second order MS experiments confirmed the assignment of the protonated molecule ($[M+H]^+$) of all identified peaks through the fragments expected for the carotenoid polyene chain and functional groups (Table 1). Considering that a detailed description of carotenoid identification using the above information was already reported [11,20], only some of the most important aspects were discussed below.

Figures 1 and 2 show the chromatograms obtained by HPLC on a C_{30} column. As expected for reversed-phase columns, polar carotenoids with three and two hydroxy groups, such as *all-trans* and 9-*cis*-neoxanthin (peaks 1 and 2) and lutein (peak 9), eluted before the monohydroxy carotenoids (*all-trans*- β -cryptoxanthin, peak 14). The carotenes, *all-trans*- α -carotene (peak 17) and *all-trans*- β -carotene (peak 18), were the last to elute under these conditions.

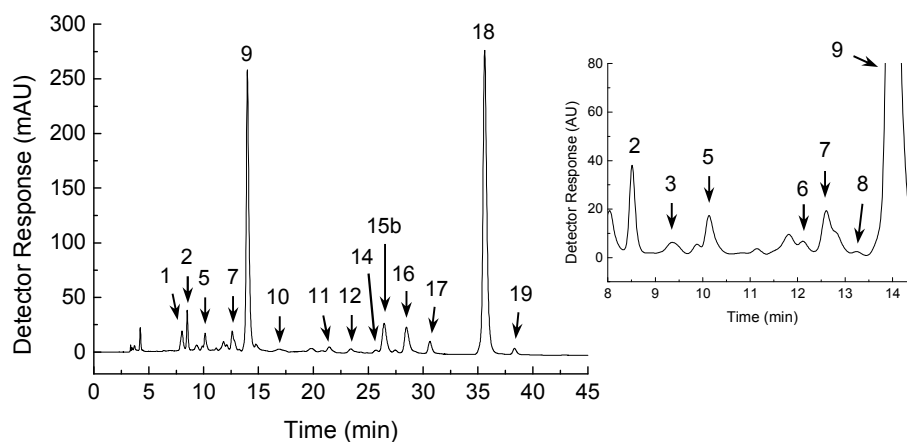


Figure 1 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoids from jackfruit batch B. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm.

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from jackfruit, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.

Peak ^a	Carotenoid	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	%III/II	%A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragment ions (m/z)
1	all- <i>trans</i> -neoxanthin	7.9-8.0	416, 440, 469	86	0	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
2	9- <i>cis</i> -neoxanthin	8.1-8.6	327, 416, 439, 468	77	16	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 393, 221
3	all- <i>trans</i> -neochrome	9.4	398, 421, 448	88	n.c. ^d	601	583[M+H-18] ⁺ (in source)
4	not identified	9.7	400, 424, 448	57	n.c.	n.d. ^e	n.d.
5	all- <i>trans</i> -luteoxanthin	9.6-10.2	399, 421, 448	96	0	601	583[M+H-18] ⁺ (in source)
6	<i>cis</i> -antheraxanthin	11.7-12.2	420, 443, 472	50	n.c.	585	567[M+H-18] ⁺ , 549[M+H-18-18] ⁺ , 221
7	9- <i>cis</i> -violaxanthin	12.1-12.7	327, 411, 435, 463	89	21	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 547[M+H-18-18-18] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
8	<i>cis</i> -luteoxanthin	13.3	395, 417, 443	n.c.	n.c.	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18-18] ⁺ , 509[M+H-92] ⁺ , 491[M+H-18-92] ⁺ , 221
9	all- <i>trans</i> -lutein	13.1-14.2	420, 444, 472	61	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 495[M+H-18-56] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺
10	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	17.0	427, 450, 475	n.c.	n.c.	569	551[M+H-18] ⁺ (in source)
11	all- <i>trans</i> -zeinoxanthin	21.4-21.5	419, 445, 473	63	0	553	535[M+H-18] ⁺
12	<i>cis</i> -zeinoxanthin	23.5	419, 443, 471	20	n.c.	553	535[M+H-18] ⁺
13	all- <i>trans</i> -α-cryptoxanthin	24.3-24.4	420, 446, 472	57	0	553	535[M+H-18] ⁺
14	all- <i>trans</i> -β-cryptoxanthin	25.6-25.7	425, 450, 475	20	0	553	535[M+H-18] ⁺
15a	15- <i>cis</i> -β-carotene	26.5-26.6	337, 422, 450, 471	10	n.c.	537	n.d.
15b	not identified	26.5	462	0	n.c.	n.d.	551, 533, 495, 439
16	13- <i>cis</i> -β-carotene	28.3-28.5	337, 420, 444, 470	14	43	537	444[M-92] ⁺

Table 1 Chromatographic, UV-Vis and mass spectrometry characteristics of carotenoids from jackfruit, obtained by HPLC-DAD-MS/MS – continued.

17	all- <i>trans</i> - α -carotene	30.5-30.7	420, 445, 473	62	0	537	444[M-92] ⁺ , 481[M+H-56] ⁺
18	all- <i>trans</i> - β -carotene	35.4-35.7	426, 451, 478	30	0	537	444[M-92] ⁺
19	9- <i>cis</i> - β -carotene	38.2-38.4	335, 421, 447, 472	30	20	537	444[M-92] ⁺

^a Numbered according to Figures 1 and 2

^b Range of retention time on the C₃₀ column

^c Linear gradient of methanol/MTBE

^d n.c.: not calculated

^e n.d.: not detected

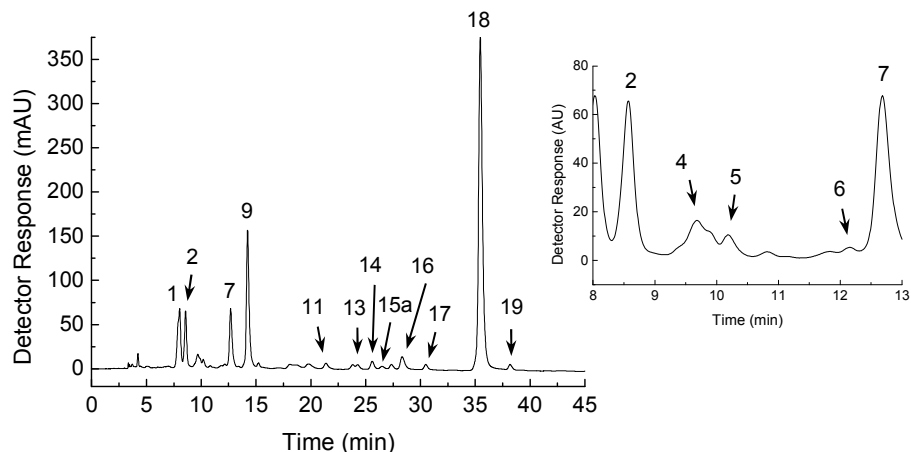


Figure 2 Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of carotenoids from jackfruit batch C. Chromatographic conditions: see text. Processed at 450 nm.

The carotenoids with 5,6-epoxide and/or 5,8-furanoid groups located at the 3- or 3'-hydroxy β -rings, all-*trans*-neoxanthin (peak 1), 9-*cis*-neoxanthin (peak 2), all-*trans*-neochrome (peak 3), all-*trans*-luteoxanthin (peak 5), *cis*-antheraxanthin (peak 6), 9-*cis*-violaxanthin (peak 7) and *cis*-luteoxanthin (peak 8), showed UV-Vis and mass spectra features similar to those reported in the literature [11,19,20]. The identification of 9-*cis*-neoxanthin was verified by injection of carotenoid extracts from kale containing this carotenoid [24]. The location of the *cis* double in 9-*cis*-violaxanthin (peak 7) was assigned by comparison of the UV-Vis spectrum characteristics with those described by Meléndez-Martínez et al. [25] in a study involving many violaxanthin isomers. These xanthophylls were found in all three jackfruit batches, with exception of all-*trans*-neochrome and *cis*-luteoxanthin, which were detected only in one batch.

Despite that all-*trans*-lutein (peak 9) and all-*trans*-zeaxanthin (peak 10) have the same chemical formula ($C_{40}H_{56}O_2$) and, therefore, identical protonated molecule (m/z 569), zeaxanthin possess two β -rings, while lutein has one β -ring and one ϵ -ring. Thus, one of the lutein hydroxyl groups is allylic to the double

bound in the ϵ -ring and not conjugated with the polyene chain, resulting in ten conjugated double bonds (c.d.b.). On the other hand, zeaxanthin has both double bonds in β -ring conjugated to the polyene chain, and consequently its chromophore shows eleven c.d.b. Therefore, it is possible to distinguish them by UV-visible and mass spectra. As expected, zeaxanthin showed λ_{\max} values (427, 450, 475 nm) higher than those from lutein (420, 444, 472 nm). The mass spectrum of zeaxanthin showed a more intense protonated molecule peak (m/z 569) as compared to the fragment at m/z 551 $[M+H-18]^+$, whereas for lutein the contrary was observed, as previously reported by De Rosso and Mercadante [11]. All-*trans*-lutein was found in all three batches, whereas zeaxanthin was detected only in one.

On the other side, all-*trans*-zeinoxanthin (peak 11) and all-*trans*- α -cryptoxanthin (peak 12), both with the same chemical formula ($C_{40}H_{56}O$), show as the only structural difference the position of the hydroxyl group, which is located either at the C-3' in the ϵ -ring allylic to the double bond as in the case of α -cryptoxanthin or at the C-3 in the β -ring as in zeinoxanthin. Therefore, both xanthophylls possess the same chromophore and as a consequence it is not possible to distinguish between these isomers by UV-Vis spectra. Although these carotenoids presented the same protonated molecule (m/z 553), their differentiation can be carried out by mass spectrometry since the zeinoxanthin MS showed a more intense protonated molecule peak (m/z 553) than the fragment at m/z 535 $[M+H-18]^+$, whilst for α -cryptoxanthin the contrary was observed [11]. The exact location of the hydroxyl group is important for the correct calculation of vitamin A value, since all-*trans*-zeinoxanthin does not have provitamin activity, whereas all-*trans*- α -cryptoxanthin shows 50 % activity. This fact is more significant when these xanthophylls are present in higher amounts, such as in the tropical fruit cacha [26].

Peak 12 was characterized as *cis*-zeinoxanthin, most probably at the 9-*cis* position due to its elution order after the corresponding all-*trans*- isomer, λ_{\max} values with a 2 nm hypsochromic shift and decreased spectral fine structure as

compared to the all-*trans*-zeinoxanthin (peak 11). All-*trans*-zeinoxanthin was found in two batches, *cis*-zeinoxanthin and all-*trans*- α -cryptoxanthin were found only in one batch.

It is worthwhile to mention that although all-*trans*- β -cryptoxanthin (peak 14) was found in all batches of jackfruit analyzed; its *cis* isomers were not detected.

The *cis* isomers of β -carotene (peaks 15a, 16 and 19) were identified by comparison with standards and literature data [11,20,27-29], taking into account the decreased spectral fine structure ($\%III/II$) and increased intensity of the *cis*-peak ($\%A_B/A_{II}$) as the *cis*-double bond was getting closer to the centre of the molecule [30]. All-*trans*- β -carotene (peak 18) and all-*trans*- α -carotene (peak 17) were identified by elution order on C₃₀ column, UV-Vis and mass spectra characteristics as compared to standards and to the literature [11,19,20,28]. In order to avoid misidentification between *cis*-isomers of β -carotene and all-*trans*- α -carotene, it is necessary to note some important different features, mainly on their UV-Vis spectra characteristics. As illustrated in Figure 3, the UV-Vis spectrum of all-*trans*- α -carotene showed higher spectral fine structure as compared to those from β -carotene *cis*-isomers; in addition, the UV-Vis spectra of the *cis*-isomers of β -carotene showed the *cis*-peak located at 335-337 nm, which did not appear in the all-*trans*- α -carotene UV-Vis spectrum. Among the β -carotene isomers, three of them (all-*trans*, 13-*cis*- and 9-*cis*-) were found in all jackfruit batches, whilst 15-*cis*- β -carotene was found only in one batch. All-*trans*- α -carotene was found in two batches.

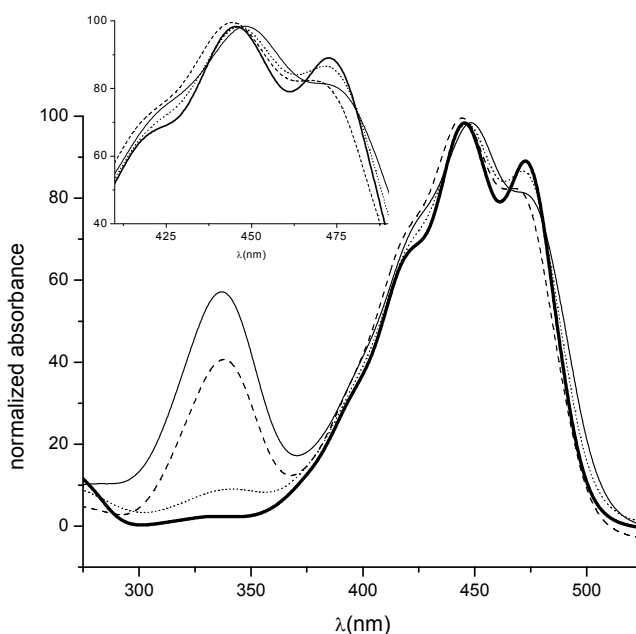


Figure 3 UV-Vis spectra, obtained by HPLC-DAD, of all-*trans*- α -carotene (bold solid line), 9-*cis*- β -carotene (dot line), 13-*cis*- β -carotene (dash line) and 15-*cis*- β -carotene (solid line).

Among the eighteen carotenoids identified in the jackfruit batches analyzed in this study, all-*trans*-lutein, all-*trans*- β -cryptoxanthin, all-*trans*- α -carotene and all-*trans*- β -carotene were also reported by other researchers [12-14], while all the other 14 carotenoids are being reported for first time in jackfruit. On the other hand, Chandrika et al. [14] found α - and β -zeacarotene, 5,6-epoxy- β -carotene and crocetin, and Setiawan et al. [13] detected lycopene, all not found in the present study. However, in none of these reports the MS technique was applied. In fact, this kind of probably misidentification is common to occur when the recommended minimum criteria for carotenoid identification were not fulfilled. Another example is the identification of echinenone in palm oil [31], which is a carotenoid so far only found in algae, bacteria and marine animals [19].

Quantitative Composition

According to Figures 1 and 2, and considering the data on Table 2, the major carotenoids were all-*trans*- β -carotene (peak 18), varying from 24 % (batch A) to 30 % (batch C) of the total carotenoid content, and all-*trans*-lutein (peak 9), ranging between 24 % (batch C) and 44 % (batch B). Moreover, the batches A and C showed notable proportions of all-*trans*-neoxanthin (peak 1), 19 % and 12 %, respectively, and of 9-*cis*-neoxanthin (peak 2), 9 % in both batches. It was also notable the presence of 9-*cis*-violaxanthin (10 %) in batch C. Concerning the proportion of the major carotenoids, the main difference was observed for the all-*trans*-lutein proportion, which was 1.5-1.8 times higher in batch B as compared to batches A and C. The other differences are related to minor carotenoids, giving different global profiles.

The content of polyhydroxy carotenoids from batch A (70.5 %) was significantly higher than those found in batches B (61.5 %) and C (60.1 %). In addition, the contents of monohydroxy carotenoids varied from 1.9 % (batch A) to 5.7 % (batch C), and the carotene levels were 27.5, 34.1 and 33.3 % for batches A, B and C respectively. These results denote that, most probably, the transcription levels of the genes responsible for the carotenoid synthesis (carotenogenic gene expression) were different for the analyzed jackfruit batches, specially the genes responsible for the hydroxylation reactions (β -hydroxylase and ϵ -hydroxylase), which lead to the accumulation of poly and monohydroxy carotenoids [32].

Table 2 Concentration ($\mu\text{g}/100$ g fresh weight) of carotenoids in different batches of jackfruit and their vitamin A values (μg RAE/ 100 g fresh weight).

Carotenoids	Batch A	Batch B	Batch C	Average
<i>all-trans</i> -neoxanthin	6.33 ± 0.15^a	5.01 ± 0.53^a	17.13 ± 1.53^b	8.85 ± 5.73
<i>9-cis</i> -neoxanthin	3.19 ± 0.15^a	5.28 ± 0.29^b	12.92 ± 0.12^c	6.87 ± 4.25
<i>all-trans</i> -neochrome	not detected	2.05 ± 0.30	not detected	0.88 ± 1.11
not identified	not detected	not detected	5.68 ± 0.34	1.62 ± 2.77
<i>all-trans</i> -luteoxanthin	0.77 ± 0.02^a	2.71 ± 0.07^b	2.38 ± 0.10^c	2.06 ± 0.90
<i>cis</i> -antheraxanthin	1.64 ± 0.14^a	0.87 ± 0.02^b	0.98 ± 0.05^b	1.12 ± 0.36
<i>9-cis</i> -violaxanthin	1.79 ± 0.02^a	4.89 ± 0.13^b	15.54 ± 0.37^c	7.05 ± 5.97
<i>cis</i> -luteoxanthin	not detected	0.78 ± 0.02	not detected	0.34 ± 0.42
<i>all-trans</i> -lutein	10.36 ± 1.10^a	55.61 ± 3.18^b	35.80 ± 0.72^c	37.02 ± 20.34
<i>all-trans</i> -zeaxanthin	not detected	2.23 ± 0.13	not detected	0.96 ± 1.20
<i>all-trans</i> -zeinoxanthin	not detected	2.20 ± 0.03^a	2.74 ± 0.01^b	1.72 ± 1.20
<i>cis</i> -zeinoxanthin	not detected	2.10 ± 0.05	not detected	0.90 ± 1.12
<i>all-trans</i> - α -cryptoxanthin	not detected	not detected	1.24 ± 0.10	0.35 ± 0.60
<i>all-trans</i> - β -cryptoxanthin	0.67 ± 0.04^a	1.22 ± 0.06^b	1.76 ± 0.01^c	1.21 ± 0.45
<i>15-cis</i> - β -carotene	not detected	not detected	0.63 ± 0.01	0.18 ± 0.31
not identified	not detected	3.84 ± 0.12	not detected	1.65 ± 2.05
<i>13-cis</i> - β -carotene	0.70 ± 0.09^a	3.79 ± 0.17^b	2.19 ± 0.02^c	2.45 ± 1.40
<i>all-trans</i> - α -carotene	not detected	2.06 ± 0.12^a	1.26 ± 0.03^b	1.24 ± 0.93
<i>all-trans</i> - β -carotene	8.33 ± 1.29^a	33.32 ± 1.48^b	45.12 ± 0.65^c	29.55 ± 15.46
<i>9-cis</i> - β -carotene	0.36 ± 0.03^a	0.99 ± 0.09^b	0.93 ± 0.01^b	0.79 ± 0.30
Total Carotenoids	34.13 ± 2.71^a	128.97 ± 2.83^b	150.34 ± 6.70^c	107.98 ± 51.46
Vitamin A Value	0.77 ± 0.11^a	3.27 ± 0.14^b	4.26 ± 0.29^c	2.84 ± 1.49

^{a,b,c} Different superscripts in the same row indicate mean difference at significant level of 5 %

Average and standard deviation of duplicated analysis

Limit of detection: lutein: $0.05 \mu\text{g}/100\text{g}$, zeaxanthin: $0.10 \mu\text{g}/100\text{g}$, β -cryptoxanthin: $0.05 \mu\text{g}/100\text{g}$, α -carotene: $0.08 \mu\text{g}/100\text{g}$ and β -carotene: $0.02 \mu\text{g}/100\text{g}$

Cyclization of lycopene is a branch point in the carotenoid biosynthetic pathway, the β,β cyclization leads to β -carotene and its derivatives, and the β,ϵ branch leads to α -carotene and its derivatives (zeinoxanthin and lutein) [33]. Our results suggest that the carotenoid biosynthetic pathway was affected by either of genetic, agricultural and/or geographical factors. Most probably the lycopene ϵ -cyclase gene had higher transcription in batches A and B, since the lutein contents were 1.2-1.7 times higher than those of β -carotene. On the other hand, β -carotene level was 1.3 times higher than lutein content in batch C, most probably due to the highest gene expression of lycopene β -cyclase.

In addition, almost all carotenoid contents were significantly different ($P < 0.05$) among the batches, as shown on Table 2. Quantitatively, batch A was the most different one, showing the lowest total carotenoid content, about four times significantly lower ($P < 0.05$) than those from batches B and C.

The ratio between the contents of *trans/cis* carotenoids was significantly higher for batch B (5.9, $P < 0.05$) as compared to those from batches A and C, with similar ratio values (3.4 e 3.5, respectively). In addition, 9-*cis*-neoxanthin, *cis*-antheraxanthin and 9-*cis*-violaxanthin represented between 59.0 (batch B) and 88.7 % (batches C) of the total *cis*-carotenoids content.

In general, considering the average contents of carotenoids in different batches (Table 2), the β -carotene, β -cryptoxanthin and total carotenoids contents found in this work were considerably lower than those reported by Setiawan et al. [13], Chandrika et al. [14] and Jagadeesh et al. [3]. However, the results from batches B and C were consistent with those reported by Tee and Lim [12], 223 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ for total carotenoids, being 43 % of lutein (95 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and 25 % of β -carotene (56 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). In addition, the carotenoid content in batch A was similar to that reported for jackfruit from Brazil [34].

For vitamin A activity, a carotenoid must have at least one unsubstituted β -ionone ring with an attached polyene side chain of at least eleven carbon.

According to these important structural requirements, among the eighteen identified carotenoids, only seven of them showed vitamin A activity: α -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene (all-*trans*- and *cis*-isomers). As shown on Table 2, the provitamin A values calculated for jackfruit batches were in the range of 0.8 to 4.3 μg RAE/100 g, with an average value of 2.8 μg RAE/100 g. These results are similar to that of 5.5 μg RAE/100 g reported by Tee and Lim [12].

In summary, in the present study, eighteen carotenoids were successfully separated, identified and quantified by HPLC-DAD-MS/MS; fourteen of them being detected for the first time in jackfruit. Among the analyzed batches, the differences were concerned either to qualitative or quantitative composition of carotenoids, which may denote that the commercial batches available represent different jackfruit cultivars or varieties.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Funding Agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for their financial support.

References

1. Man YBC, Sin KK (1997) Processing and consumer acceptance of fruit leather from the unfertilised floral parts of jackfruit. *J Sci Food Agric* 75: 102-108.
2. Donadio LC (2007) *Dicionário das frutas*. Jaboticabal: Santa Terezinha, pp 129-30.

3. Jagadeesh SL, Reddy BS, Swamy GSK, Gorbak K, Hegde L, Raghavan GSV (2007) Chemical composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) selections of Western Ghats of India. *Food Chem* 102: 361-365.
4. Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA (2003) Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann Rev Nutr* 23: 171-201.
5. Stanner SA, Hughes J, Kelly CNM, Buttriss J (2004) A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr* 7: 407-422.
6. Coyne T, Ibiebele TI, Baadr PD, Dobson A, McClintock C, Dunn S, Leonard D, Shaw J (2005) Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *Amer J Clin Nutr* 82: 685-693.
7. Stahl W, Sies H (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis* 1740: 101-107.
8. Pfander H, Riesen R, Niggli U (1994) HPLC and SFC of carotenoids – scope and limitations. *Pure Appl Chem* 66: 947-954.
9. Liaaen-Jensen S (1995) Combined approach: identification and structure elucidation of carotenoids. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*. Basel: Birkäuser, pp 343-354.
10. Schiedt K, Liaaen-Jensen S (1995) Isolation and Analysis. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids, Vol 1A: Isolation and Analysis*. Basel: Birkäuser, pp 81-108.
11. De Rosso VV, Mercadante AZ (2007) Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 55: 5062-5072.

12. Tee ES, Lim CL (1991) Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. *Food Chem* 41: 309-339.
13. Setiawan B, Sulaeman A, Giraud DW, Driskell JA (2001) Carotenoid content of selected Indonesian fruits. *J Food Compos Anal* 14: 169-176.
14. Chandrika UG, Jansz ER, Warnasuriya ND (2005) Analysis of carotenoids in ripe jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) kernel and study of their bioconversion in rats. *J Sci Food Agric* 85: 186-190.
15. Pfister S, Meyer P, Steck A, Pfander H (1996) Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne). *J Agric Food Chem* 44: 2612-2615.
16. Caballero-Ortega H, Pereda-Miranda R, Abdullaev FI (2007) HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chem* 100: 1126-1131.
17. Back S, Enzell CR (1995) Mass Spectrometry. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*. Basel: Birkhäuser, pp 261-320.
18. Britton G (1995) UV/visible spectroscopy. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy*. Basel: Birkhäuser, pp 13-62.
19. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (2004) *Carotenoids Handbook*. Basel: Birkhäuser.
20. De Rosso VV, Mercadante AZ (2007) HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric Food Chem* 55: 9135-9141.

21. Shabir GA (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A* 987: 57-66.
22. NAS-IOM (2001) Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington: National Academy Press, pp 92.
23. Bauerfeind JC (1972) Carotenoid vitamin A precursors and analogues in foods and feeds. *J Agric Food Chem* 20: 456-473.
24. Strand A, Kvernberg K, Karlsen AM, Liaaen-Jensen S (2000) Geometrical *E/Z* isomers of (6*R*)- and (6*S*)-neoxanthin and biological implications. *Biochem Syst Ecol* 28: 443-455.
25. Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2007) Geometrical isomers of violaxanthin in orange juice. *Food Chem* 104: 169-175.
26. Hamano PS, Mercadante AZ (2001) Composition of carotenoids from commercial products of *caja* (*Spondias lutea*). *J Food Compos Anal* 14: 335-343.
27. Strohschein S, Pursch M, Albert K (1999) Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C_{30} stationary phase. *J Pharm Biomed Anal* 21: 669-677.
28. Dachtler M, Glaser T, Kohler K, Albert K (2001) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal Chem* 73: 667-674.
29. Ornelas-Paz JJ, Yahia EM, Gardea-Bejar A (2007) Identification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of

-
- seven Mexican mango cultivars by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization – time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCI⁺)-MS]. *J Agric Food Chem* 55: 6628-6635.
30. Zechmeister L (1944) *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. *Chem Rev* 34: 267-344.
31. Darnoko D, Cheryan M, Moros E, Jerrel J, Perkins EG (2000) Simultaneous HPLC analysis of palm carotenoids and tocopherols using a C-30 column and photodiode array detector. *J Liq Chrom & Rel Technol* 23: 1873-1885.
32. Howitt, CA, Pogson, BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29, 435-445.
33. Britton G (1998) Overview of carotenoid biosynthesis. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids, Vol 3: Biosynthesis and metabolism*. Basel: Birkhäuser, pp 13-147.
34. Barreto GPM, Benassi MT, Mercadante AZ (2009) Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *J Braz Chem Soc.* (accepted)

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*)

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista

Journal of Agricultural and Food Chemistry

RESUMO

A composição de carotenoides e compostos fenólicos de frutos de jabolão (*Syzygium cumini*) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS). Foram encontrados dois carotenoides principais: all-trans-luteína (43,7 %) e all-trans- β -caroteno (25,4 %). A composição de antocianinas foi marcada pela presença de diglucosídeos de cinco das seis agliconas comumente encontradas em alimentos, sendo que as principais antocianinas foram delphinidina 3,5-diglucosídeo (45 %), petunidina 3,5-diglucosídeo (32 %) e malvidina 3,5-diglucosídeo (15 %). Esse padrão também foi observado para outros flavonoides, onde os principais compostos identificados foram diglucosídeos de diidromirecetina, metil-diidromirecetina e dimetil-diidromirecetina, além de mirecetina glucosídeo e um éster de galoil-glucose. Além da composição de compostos bioativos, a atividade antioxidante de um extrato funcional rico em antocianinas foi avaliada, em diferentes condições de pH, por meio da atividade antirradical ABTS^{•+} e efeito protetor frente ao ¹O₂. A atividade antirradical ABTS^{•+} foi dependente do pH do meio, com valores de TEAC entre 4,8 (pH 1,0) e 12,7 μ mol Trolox/g fruta (pH 5,0). O extrato funcional apresentou cerca de 60% de proteção ao dimetilantraceno frente à oxidação por ¹O₂, em condições de pH 1,0 e 3,0, sendo essa atividade superior àquela apresentada por outras frutas vermelhas.

Palavras-chave: antocianinas, ABTS^{•+}, atividade antioxidante, carotenoides, flavonoides, HPLC-DAD-MS/MS, oxigênio singlete, pH, TEAC

1. Introdução

O jambolão (*Syzygium cumini*), como é popularmente conhecido no Brasil, é uma planta da família MYRTACEAE, oriunda da Ásia tropical, mais especificamente da Índia, sendo encontrado como floresta nativa desde as planícies ao sul do Himalaia até a Oceania, África e Havaí. Tem como sinônímia os nomes de *Eugenia jambolana*, *Myrtus cumini*, *Syzygium jambolanum* DC e *Eugenia cumini* (Loguercio & Battistin, 2004). No Brasil, o jambolão adaptou-se muito bem no Nordeste, embora seja também encontrado em estados do sul e sudeste, como Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Os frutos de jambolão são pequenos, com 2-3 cm de comprimento, e apresentam forma ovoide de coloração roxo-avermelhada a quase negra quando maduros. O fruto ainda possui uma semente única e grande, quando comparada com o tamanho do fruto, envolta por uma polpa carnosa com sabor adstringente, que pode ser de coloração rosada ou praticamente branca. No Brasil, a frutificação ocorre de janeiro a maio. Na Índia, o jambolão, além de ser consumido *in natura*, é usado na confecção de doces e tortas, enquanto que no Brasil, o jambolão tem sido cultivado como planta ornamental (Benherlal & Arumughan, 2007; Li *et al.*, 2009a), sendo que o fruto também é consumido *in natura*.

Devido ao uso popular das folhas e frutas de jambolão para auxiliar no tratamento de diabetes, nos últimos anos surgiram alguns estudos com o objetivo de avaliar as propriedades antioxidantes de extratos obtidos de diferentes partes da planta. Foi demonstrado, por exemplo, que o germe da semente destas frutas restaurou as alterações lipídicas causadas pela diabetes (Ravi *et al.*, 2005) e apresentou elevada atividade frente aos radicais superóxido e hidroxila quando comparado a padrões como catequina e trolox (Benherlal & Arumughan, 2007). Comparado com extratos de outras frutas, os extratos de frutos de jambolão apresentaram alta atividade antioxidante induzida por acetato de cobre em lipossomas, enquanto que no sistema β -caroteno-ácido linoleico esta atividade foi intermediária (Hassimoto *et al.*, 2005). Essas propriedades, de uma forma geral,

estão relacionadas à presença de compostos bioativos na planta, principalmente flavonoides e outros compostos fenólicos.

Entre os compostos fenólicos encontrados na natureza estão os ácidos fenólicos e os flavonoides, sendo que estes últimos ainda podem ser divididos em diferentes grupos ou subclasses, tais como flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonóis, flavanonas, antocianidinas e catequinas. Esses grupos diferenciam-se por variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais na estrutura básica de 15 carbonos ($C_6-C_3-C_6$), podendo ainda ser glicosilados com diferentes açúcares, os quais podem estar acilados ou não, levando a cerca de 9000 flavonoides diferentes encontrados na natureza. Devido a uma forte tendência das plantas taxonomicamente relacionadas produzirem tipos similares de flavonoides, estes compostos costumam ser usados como marcadores taxonômicos (Cuyckens & Claeys, 2004; Williams & Grayer, 2004).

As antocianinas constituem um grupo especial dentro dos flavonoides pelo fato desses compostos apresentarem coloração intensa, sendo responsáveis pelas cores azul, vermelha, violeta ou púrpura de muitas flores e frutos. O grande número de antocianinas diferentes, mais de 500, encontrado em plantas é devido à variação na natureza do glicosídeo e do ácido, já que até hoje, apenas 15 agliconas foram caracterizadas (Strack & Wray, 1994). Em alimentos, as agliconas são representadas pelas seis antocianidinas mais comuns, das quais a cianidina é a mais frequente, seguida de peonidina e delphinidina, e por fim pelargonidina, malvidina e petunidina (Wu & Prior, 2005).

Por outro lado, os carotenoides são pigmentos de coloração amarela a vermelha, encontrados no reino vegetal, animal e em microrganismos, cuja estrutura básica é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono. A modificação dessa estrutura básica, como por exemplo, presença de grupos funcionais hidroxílicos, carboxílicos e/ou epóxidos, bem como grupos terminais acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos, leva a uma grande diversidade de estruturas químicas (Britton, 1995), sendo que mais de 600 carotenoides já foram identificados na natureza.

Tanto os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, como os carotenoides, têm sido considerados compostos bioativos devido às suas propriedades antioxidantes e efeitos benéficos na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e diabetes.

As principais antocianinas de jambolão foram identificadas como 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina (Brito *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a; Veigas *et al.*, 2007). No entanto, não foram encontradas na literatura informações a respeito da identificação de compostos fenólicos não antociânicos, assim como de carotenoides, em frutos de jambolão. Considerando o exposto, o objetivo do presente trabalho foi quantificar compostos bioativos presentes em frutos de jambolão, bem como identificar os compostos fenólicos e carotenoides dessa fruta por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS). Além disso, a atividade antioxidante de um extrato funcional rico em antocianinas foi avaliada, em diferentes condições de pH, por meio da atividade antirradical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) e do efeito protetor frente ao oxigênio singlete.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Frutos maduros de jambolão, safra 2008, foram obtidos, junto a produtores na cidade de Pelotas, RS, e armazenados a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os frutos classificados como maduros foram aqueles que apresentavam casca com coloração roxa escura. Para a obtenção dos extratos, os frutos foram descaroçados e a parte comestível (polpa e casca) foi homogeneizada.

Padrões de cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-galactosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-ramnosídeo, pelargonidina 3-

glucosídeo, peonidina 3-glucosídeo, cianidina, pelargonidina, quercetina 3-galactosídeo, quercetina 3-ramnosídeo, epicatequina e dos ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, cafeico, coumárico, ferúlico e elágico foram obtidos da Extrasynthèse (Genay, França). Padrões de rutina, quercetina 3-glucosídeo, quercetina, naringenina, luteolina, ácido tânico e ácido ascórbico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Alemanha). Padrões de naringina, mirecetina, apigenina, kaempferol e catequina foram obtidos da Fluka (Steinheim, Alemanha). Padrões de all-*trans*- de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e α -caroteno, assim como dos isômeros 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis*- β -caroteno foram cedidos pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça). Todos os padrões apresentavam no mínimo 95 % de pureza.

Os reagentes [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (ABTS), persulfato de potássio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), azul de metileno (MB), dimetilantraceno (DMA) e albumina bovina (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o reagente de Folin-Ciocalteu foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os solventes, ácidos e sais grau p.a. utilizados foram adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil). Os solventes grau cromatográfico (HPLC) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, MT). A água destilada foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA).

Para as análises cromatográficas, as amostras e os solventes foram filtrados utilizando, respectivamente, membranas de 0,22 e 0,45 μm da Millipore.

2.2. Equipamentos

As análises de quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas monoméricas e taninos, assim como as medidas dos espectros de absorção UV-visível e os testes de atividade antioxidante foram realizados em um espectrofotômetro Agilent 8453 (Santa Clara, CA).

Para a excitação do fotossensibilizador (azul de metileno) e consequente formação de oxigênio singlete foi utilizada uma lâmpada incandescente de xenônio (150 W), associada a um filtro de luz de cor vermelha, permitindo somente a passagem de luz com comprimento de onda maior que 600 nm.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com sistema de bombeamento quaternário (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão), desgaseificador *on line* e válvula de injeção *Rheodyne* de 20 μ L, conectado em série a um detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, modelo SPD-M20A) e um espectrômetro de massas (MS) com analisador *ion trap*, modelo Esquire 4000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), equipado com interfaces *eletrospray* (ESI) e de ionização química a pressão atmosférica (APCI).

2.3. Extratos

2.3.1. Compostos fenólicos

As antocianinas foram exaustivamente extraídas a partir de 3,0 g de fruta homogeneizada (polpa + casca), utilizando etanol com 1 % de HCl, enquanto que os demais compostos fenólicos foram exaustivamente extraídos a partir de 10,0 g de fruta, com solução de metanol/água (8:2). Além destes dois extratos, foi obtido um terceiro extrato, rico em antocianinas, denominado extrato funcional (EF), que foi utilizado para avaliação das propriedades antioxidantes. Para a obtenção do EF, 4 amostras com 10 g de fruta foram extraídas utilizando etanol com 5 % de H_3PO_4 e os extratos foram combinados. Todos os extratos (antocianinas, compostos fenólicos e EF) foram obtidos por meio de agitação em um homogeneizador Metabo GE700 (Nürtingen, Alemanha), seguido de filtração a vácuo. Em seguida, esses extratos foram concentrados em evaporador rotatório ($T < 35\text{ }^\circ\text{C}$) para remoção da maior quantidade possível do solvente orgânico, o volume foi ajustado com água deionizada acidificada com HCl (pH 1,0) e os extratos foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio, a $-36\text{ }^\circ\text{C}$. Todos os procedimentos de extração foram realizados em duplicata.

O extrato de antocianinas (etanol 1 % HCl) foi utilizado para quantificação de antocianinas monoméricas da fruta e identificação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS. O extrato de compostos fenólicos (metanol/água 8:2) foi utilizado para quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos da fruta e identificação de flavonoides por HPLC-DAD-MS/MS. O extrato funcional foi utilizado para estudo da atividade antioxidante, após ser submetido a caracterização de compostos bioativos (conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas, taninos, ácido ascórbico e carotenoides).

Antes da análise por HPLC-DAD-MS/MS, o extrato de antocianinas foi submetido a uma purificação parcial para remoção de açúcares, utilizando coluna de XAD-7 (Sigma), segundo método descrito por Degenhardt *et al.* (2000).

2.3.2. Carotenoides

Os carotenoides foram exaustivamente extraídos, a partir de 15,0 g de fruta homogeneizada (polpa + casca), por meio de maceração em almofariz com acetona. Esse extrato foi filtrado, transferido para éter de petróleo/éter etílico (2:1) e submetido à saponificação com 10 % de KOH em metanol a temperatura ambiente por uma noite, seguido de lavagem para retirada completa do álcali (De Rosso & Mercadante, 2007a). Os carotenoides do EF foram extraídos por meio de extração líquido-líquido com acetato de etila. Ambos os extratos foram submetidos à evaporação completa do solvente em evaporador rotatório ($T < 40^{\circ}\text{C}$) e o extrato seco, sob atmosfera de nitrogênio, foi armazenado a -36°C .

2.3.3. Ácido Ascórbico

A extração de ácido ascórbico foi realizada a partir de 10,0 g de fruta ou de 10 mL de EF. Ambos extratos foram preparados utilizando 30 mL de solução aquosa 1 % de ácido oxálico, por meio de agitação, seguida de filtração, e lavagem adicional da amostra com 10 mL da solução extratora (Benassi & Antunes, 1988). O extrato foi transferido para balão volumétrico de 50 mL, sendo o

volume completado com a mesma solução utilizada para extração, e submetido imediatamente à análise cromatográfica (de acordo com método descrito no item 2.5.3).

2.4. Análise quantitativa de compostos fenólicos

2.4.1. Compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada, tanto no EF como no extrato da fruta obtido com metanol/água, pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton & Rossi (1965), por meio de reação com reagente Folin na presença de solução aquosa de carbonato de sódio 0,26 mol/L (concentração final), durante 90 min no escuro, seguido de leitura da absorbância em 765 nm. A quantificação foi realizada com base em curva de calibração de ácido gálico (2,0-8,0 mg/L), sendo os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g amostra (base úmida).

2.4.2. Flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado, tanto no EF como no extrato da fruta obtido com metanol/água, segundo Zhishen *et al.* (1999), por meio de reação com AlCl_3 22,5 mmol/L (concentração final) na presença de NaNO_2 21,7 mmol/L (concentração final), seguido de leitura da absorbância em 510 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração de catequina (5,0-20,0 mg/L), sendo os resultados expressos em mg equivalente de catequina (CE)/100 g amostra (base úmida).

2.4.3. Antocianinas monoméricas

O teor de antocianinas monoméricas (AM) foi determinado, tanto no EF como no extrato da fruta obtido com etanol 1 % HCl, pelo método de pH diferencial, descrito por Lee *et al.* (2005). Resumidamente, o extrato foi diluído em soluções tampão pH 1,0 (cloreto de potássio 0,025 mol/L) e pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 mol/L) de forma a obter, em pH 1, absorbância de ~0,8 a 520 nm. O

extrato diluído foi mantido no escuro por 30 min e, em seguida, submetido às leituras de absorvância a 520 e 700 nm. O conteúdo de AM foi calculado como equivalente de cianidina 3-glucosídeo (cyd 3-glu), considerando peso molecular (PM) de 449,2 g/mol e absorvidade molar (ϵ) de 26900 L/mol.cm (Jurd & Asen, 1966), utilizando a equação 1.

$$AM = \frac{[(A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5}] \times MM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

onde A_{520} e A_{700} são as absorvâncias a 520 e 700 nm, respectivamente; FD é o fator de diluição e l é caminho ótico em cm.

2.4.4. Taninos

Para determinar o conteúdo de taninos, o extrato fenólico e o EF foram inicialmente submetidos à precipitação com BSA. Após 15 min, o precipitado foi coletado e re-dissolvido em solução aquosa contendo 34,7 mmol/L de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 %_{v/v} de trietanolamina e 20 %_{v/v} de isopropanol. Essa solução foi submetida à reação com FeCl₃ (concentração final de 2 mmol/L), em meio ácido (HCl 2 mmol/L, concentração final), durante 15-30 min, seguida de leitura da absorvância a 510 nm (Waterman & Mole, 1994). A quantificação foi realizada com base em curva de calibração de ácido tânico (0,2-1,2 mg/L), sendo os resultados expressos em mg equivalente de ácido tânico (TAE)/100 g amostra (base úmida).

2.5. Análises por HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS/MS

2.5.1. Compostos fenólicos

As antocianinas, tanto no EF como no extrato da fruta obtido com etanol 1 % HCl, foram separadas em uma coluna C₁₈ Shim-pack CLC-ODS (5 μ m, 250 x 4,6 mm i.d.) (Shimadzu, Canby, OR), utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos com 5 %_{v/v} de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em mais 15 min e mantendo esta proporção por 5

min. Os demais compostos fenólicos (do extrato da fruta obtido com metanol/água) foram separados em coluna C₁₈(2) Luna (5 μm, 250 x 4,6 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA), usando como fase móvel gradiente linear de água/acetonitrila, ambos com 2 %_{v/v} de ácido fórmico, de 93:7 para 86:14 em 25 min, seguindo para 80:20 em 10 min, para 70:30 em 7 min, para 20:80 em 13 min e mantendo esta proporção por 3 min. Em ambas as análises, utilizou-se fluxo de 0,9 mL/min e a temperatura das colunas foi mantida a 29 °C. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados em 280, 320, 360 e 520 nm. Após passar pela cela do DAD, o fluxo proveniente da coluna foi dividido, permitindo que somente 0,15 mL/min entrassem na fonte de ionização. Para a análise por espectrometria de massas (MS), foi utilizada fonte de ionização ESI, operando tanto no modo positivo (ESI+) como no modo negativo (ESI-), com voltagem no capilar de 2,5 e 1,5 kV, respectivamente. A voltagem na saída do capilar foi de 95,2 V para antocianinas (ESI+) e de 120 V para os demais compostos fenólicos (ESI+ e ESI-). As demais condições em ambos os modos foram: *end plate offset* -500 V, temperatura do gás de secagem (N₂) 325 °C e fluxo de 8 L/min, nebulizador a 30 psi. O MS/MS foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,2 V. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de *m/z* 100 a 1000.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em fase reversa, co-cromatografia com padrões e características dos espectros UV-visível e de massas, comparando com dados disponíveis na literatura (Cuyckens & Claeys, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007b; De Rosso *et al.*, 2008; Fabre *et al.*, 2001; Lin & Harnly, 2007; Rijke *et al.*, 2006; Sakakibara *et al.*, 2003; Wu & Prior, 2005).

2.5.2. Carotenoides

Os carotenoides foram separados em coluna C₃₀ YMC (5 μm, 250 x 4,6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, DE), usando como fase móvel um gradiente linear de

metanol/éter metil *terc*-butílico (MTBE) de 95:5 para 70:30 em 30 min, seguindo para 50:50 em 20 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C. Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 250 e 650 nm e os cromatogramas foram processados em 280, 350 e 450 nm. Para a análise por espectrometria de massas, foi utilizada fonte de ionização APCI, operando no modo positivo, com as seguintes condições: corrente de 4,0 μ A, temperatura da fonte de 450 °C, temperatura do gás de secagem (N_2) 350 °C e fluxo de 5 L/min, nebulizador a 60 psi. O espectro de MS/MS foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,4 V. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 700.

A identificação dos carotenoides foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna C_{30} , características dos espectros UV-visível ($\lambda_{m\acute{a}x}$, estrutura fina do espectro (%III/II) e intensidade do pico “cis” (% A_B/A_{II})) e de massas, comparando com padrões analisados nas mesmas condições e com dados disponíveis na literatura (Back & Enzell, 1995; Britton, 1995; Britton *et al.*, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007a,b).

Os carotenoides foram quantificados por HPLC-DAD com base em curvas de calibração para os isômeros *all-trans*- de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e β -caroteno. Os isômeros *cis*, quando presentes, foram estimados utilizando a curva de calibração do isômero *all-trans* correspondente.

2.5.3. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico foi analisado por HPLC-DAD, utilizando a coluna C_{18} Shim-pack descrita anteriormente (item 2.5.1) e como fase móvel uma solução aquosa de ácido sulfúrico a pH 2,5, em condição isocrática, com fluxo de 0,7 mL/min e temperatura da coluna de 25 °C (Souza *et al.*, 2004). Os cromatogramas foram processados a 254 nm. O limite de detecção (LOD) de 0,01 mg/100 g foi calculado, por meio da equação 2 (Shabir, 2003), usando os parâmetros de uma curva de calibração obtida para ácido ascórbico (5-60 μ g/mL).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \left(\frac{\text{DP}}{\text{CA}} \right) \quad (2)$$

onde DP é o desvio padrão da resposta e CA é o coeficiente angular do ajuste linear obtido para a curva de calibração.

2.6. Determinação da atividade antirradical ABTS^{•+}

As análises de atividade antirradical ABTS^{•+} foram realizadas de acordo com o método descrito por Re *et al.* (1999), nas condições de pH 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0, utilizando solução tampão apropriada para cada pH. O EF foi diluído em cada tampão em uma proporção de 0,7 %_{v/v}. O extrato diluído foi adicionado à solução de ABTS^{•+}, em proporção (1:1), e imediatamente iniciou-se o acompanhamento da absorbância a 734 nm por 15 minutos. Os resultados foram calculados com base em curvas de calibração de Trolox (3-20 µmol/L), obtidas para cada condição de pH, e expressos como TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox).

2.7. Determinação da atividade frente ao oxigênio singlete (¹O₂)

As análises da atividade frente ao ¹O₂ foram realizadas nas condições de pH 1,0 e 3,0, utilizando solução tampão apropriada para cada pH. Nos demais valores de pH, para diferentes tipos de solução tampão testadas, ocorreu insolubilização do azul de metileno (MB) ao misturar a solução deste composto com a solução tampão, inviabilizando esta análise nas condições de pH 5,0 a 9,0. Dimetilantraceno (DMA, 0,1 mmol/L, concentração final) foi utilizado como actinômetro e MB (10 µmol/L, concentração final) como sensibilizador, ambos dissolvidos em etanol. O EF foi diluído em tampão a uma proporção de 5 %_{v/v}. O extrato diluído foi misturado com a solução de MB, em proporção (1:1) e foi adicionada a essa mistura a solução de DMA. Esse sistema foi iluminado durante 21 min (utilizando o sistema descrito no item 2.2) e o monitoramento foi realizado por meio de medidas espectrofotométricas na faixa de 190-900 nm, no decorrer do

experimento. O percentual de inibição foi determinado considerando o decaimento da absorbância do DMA a 375 nm, de acordo com a equação 3.

$$\% \text{Proteção} = \left(\frac{k_{\text{DMA}} - k_{\text{DMA+EF}}}{k_{\text{DMA}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde k_{DMA} e $k_{\text{DMA+EF}}$ são as constantes de decaimento da absorbância do dimetilantraceno, a 375 nm, na ausência e na presença, respectivamente, do extrato funcional.

3. Resultados e Discussão

3.1. Compostos bioativos

Pode-se observar na Tabela 1 que todos os compostos bioativos estão presentes em menores concentrações no extrato funcional quando comparados aos teores encontrados na fruta. Essa diferença pode ser decorrente de dois fatores, um deles em função de que para a quantificação desses compostos na fruta foi realizada extração exaustiva, enquanto que o EF não foi obtido com extração exaustiva, já que o objetivo era obter um extrato com atividade antioxidante. O segundo fator está relacionado à capacidade de extração da solução extratora (etanol com 5 % de H_3PO_4) utilizada para obtenção do EF, responsável principalmente pela baixa extração de compostos apolares, como os carotenoides. De fato, os teores de antocianinas e de compostos fenólicos totais foram influenciados pelo tipo de solução utilizada para extração (Kapasakalidis *et al.*, 2006; Metivier *et al.*, 1980).

Tabela 1. Teores de compostos bioativos de jambolão.

Composto Bioativo	Fruta^a	EF^a
Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100 g amostra)	148,3 ± 32,4	86,3 ± 3,9
Flavonoides Totais (mg CE/100 g amostra)	91,2 ± 15,7	20,8 ± 3,3
Antocianinas Monoméricas (mg cyd 3-glu/100 g amostra)	210,9 ± 9,1	158,3 ± 26,7
Taninos (mg TAE/100 g amostra)	3,9 ± 0,8	0,20 ± 0,01
Ácido Ascórbico (mg/100 g)	< 0,01	< 0,01
Carotenoides (µg/100 g amostra)	89,2 ± 5,4	0,7 ± 0,1

^a média e desvio médio de análise em duplicata

EF – extrato funcional; GAE – equivalente de ácido gálico; CE – equivalente de catequina; cyd 3-glu – cianidina 3-glucosídeo; TAE – equivalente de ácido tânico

Era esperado um maior conteúdo de compostos fenólicos totais, tanto na fruta como no EF, embora tenha sido observado uma razoável variabilidade nos valores relatados na literatura para essa fruta, que foram entre 236 e 390 mg GAE/100 g de fruta (base úmida) (Benherlal & Arumughan, 2007; Luximon-Ramma *et al.*, 2003) e entre 596 e 995 mg GAE/100 g de fruta (base seca) (Reynertson *et al.*, 2008; Veigas *et al.*, 2007). Convém mencionar que, diferentemente do procedimento adotado neste trabalho e daquele realizado no trabalho de Benherlal & Arumughan (2007), a reação de Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais foi realizada em extratos obtidos com solvente acidificado (Reynertson *et al.*, 2008; Veigas *et al.*, 2007), o qual proporciona extração de maior quantidade de antocianinas. Além disso, é necessário considerar que uma certa variabilidade na composição da matéria-

prima pode ocorrer devido a fatores tais como condições de cultivo da planta, época de colheita dos frutos e fatores geográficos.

Por outro lado, o conteúdo de flavonoides encontrado nos frutos de jambolão no presente trabalho foi cerca de 7 e 13 vezes maior que os valores relatados anteriormente, respectivamente, de 13,5 mg/100 g (Luximon-Ramma *et al.*, 2003) e 7 mg/100 g (Benherlal & Arumughan, 2007). Esta diferença pode ser atribuída à variabilidade inerente da matéria-prima, bem como às diferenças na metodologia ou padrão utilizado. Benherlal & Arumughan (2007) trabalharam com um método um pouco diferente, fazendo reação com AlCl_3 na presença de acetato de potássio e com 2,4-dinitrofenil hidrazina (leitura em 415 nm em ambos os casos) e utilizando como padrões quercetina e naringenina, respectivamente. Luximon-Ramma *et al.* (2003) utilizaram reação com AlCl_3 , porém quercetina como padrão.

O conteúdo de antocianinas monoméricas está na mesma faixa dos valores relatados na literatura, embora estes também tenham apresentado razoável variabilidade: 134 mg cyd 3-glu/100 g (base úmida) (Benherlal & Arumughan (2007) e entre 230 e 633 mg cyd 3-glu/100 g (base seca) (Reynertson *et al.*, 2008; Veigas *et al.*, 2007).

O conteúdo de taninos foi baixo, considerando o sabor adstringente característico de jambolão. Contudo, não foram encontrados na literatura outros trabalhos onde tenha sido determinado, em frutos de jambolão, o conteúdo de taninos pelo método de precipitação de albumina bovina e reação com cloreto férrico. Luximon-Ramma *et al.* (2003) encontrou em jambolão 45 mg/100 g de proantocianidinas, quantificadas como cianidina-cloreto, utilizando um método com HCl e butanol, descrito por Porter *et al.* (1986, citado por Luximon-Ramma *et al.*, 2003) que se baseia na conversão das proantocianidinas (taninos condensados) nas respectivas antocianidinas.

O baixo conteúdo de carotenoides era esperado, tanto na fruta como no EF, considerando que essa fruta apresenta polpa de coloração clara, sendo

comparável aos teores de carotenoides totais apresentados por outras frutas ricas em antocianinas, tais como morango (26 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), mirtilo (290 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) e espécies de groselha *Ribes rubrum* (45 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) e *R. nigrum* (280 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), por exemplo (Marinova & Ribarova, 2007). Além disso, especificamente no caso do EF, este foi obtido com solução etanólica ácida, onde a solubilidade e estabilidade dos carotenoides é restrita.

Quando comparado a outras frutas da família MYRTACEAE, o jambolão apresentou um elevado conteúdo de antocianinas monoméricas (211 mg/100 g), considerando os valores relatados para camu-camu (*Myrciaria dubia*), 30-54 mg/100 g (Zanatta *et al.*, 2005), *Eugenia myrtifolia*, 33 mg/100 g (Longo *et al.*, 2007), e baguaçu (*Eugenia umbelliflora*), 324 mg/100 g (Kuskoski *et al.*, 2003). Por outro lado, o conteúdo de carotenoides totais presente em camu-camu, 355-1095 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Zanatta & Mercadante, 2007) foi de 4 a 12 vezes maior que o valor encontrado nos frutos de jambolão (89 $\mu\text{g}/100\text{ g}$).

3.2. Perfil de compostos fenólicos

A Figura 1 apresenta o cromatograma de antocianinas de jambolão, sendo que o mesmo perfil foi encontrado no extrato funcional. A Tabela 2 reúne as características cromatográficas e dos espectros UV-visível e de massas apresentadas por esses pigmentos, cujas estruturas são ilustradas na Figura 2. A diferença na extratibilidade das soluções utilizadas para obtenção do extrato de antocianinas (etanol 1 % HCl) e do extrato funcional (etanol 5 % H₃PO₄) pode ser observada por meio das proporções relativas de cada antocianina presente na fruta e no extrato funcional (Tabela 2). Entre as principais antocianinas, a proporção de delphinidina 3,5-diglucosídeo extraída na solução com ácido clorídrico (45 %) foi 1,2 vezes maior que aquela obtida com a solução contendo ácido fosfórico (37 %). Entre as antocianinas minoritárias, a extração de petunidina 3-glucosídeo, malvidina 3-glucosídeo e das antocianinas do pico 4 (peonidina 3,5-diglucosídeo e delphinidina 3-glucosídeo) foi cerca de 2 vezes maior com a solução contendo ácido fosfórico em relação à solução com ácido clorídrico.

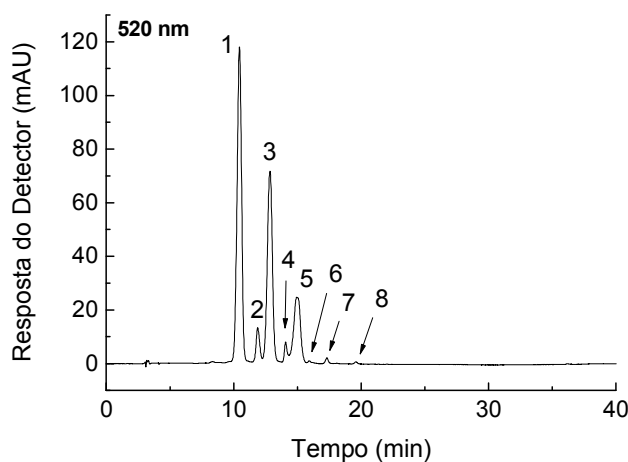


Figura 1. Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, das antocianinas de jambolão. Picos identificados de acordo com a Tabela 2. Condições cromatográficas: ver texto.

Tabela 2. Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, e composição das antocianinas de jambolão.

Pico ^a	Antocianina	t _R (min) ^b	λ _{máx} (nm) ^c	[M] ⁺ (m/z)	Íons fragmentos obtidos em MS/MS (m/z)	Fruta	EF
						(mg cyd 3-glu/100 g) ^d	
1	Delfinidina 3,5-diglucosídeo	10,3-10,4	274, 523	627	465[M-162] ⁺ , 303[M-162-162] ⁺	95,6 ± 4,2	59,0 ± 0,5
2	Cianidina 3,5-diglucosídeo	11,8-11,9	276, 515	611	449[M-162] ⁺ , 287[M-162-162] ⁺	8,8 ± 0,4	6,7 ± 0,2
3	Petunidina 3,5-diglucosídeo	12,8	274, 525	641	479[M-162] ⁺ , 317[M-162-162] ⁺	68,0 ± 1,7	53,5 ± 1,1
4a	Peonidina 3,5-diglucosídeo	14,0-14,1	275, 525	625	463[M-162] ⁺ , 301[M-162-162] ⁺	4,7 ± 0,7	7,1 ± 2,3
4b	Delfinidina 3-glucosídeo			465	303[M-162] ⁺		
5	Malvidina 3,5-diglucosídeo	14,9	274, 526	655	493[M-162] ⁺ , 331[M-162-162] ⁺	32,0 ± 1,5	29,2 ± 2,1
6a	Delfinidina acetil-diglucosídeo	15,7-15,9	278, 519	669	507[M-162] ⁺ , 465[M-204] ⁺ , 303[M-162-204] ⁺	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,1
6b	Cianidina 3-glucosídeo			449	287[M-162] ⁺		
7	Petunidina 3-glucosídeo	17,0-17,3	275, 527	479	317[M-162] ⁺	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,4
8	Malvidina 3-glucosídeo	19,4-19,6	285, 528	493	331[M-162] ⁺	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2

^a Picos numerados de acordo com a Figura 1^b Faixa de tempo de retenção na coluna C₁₈ Shim-pack^c Gradiente linear de água/metanol, ambos com 5 %_{v/v} de ácido fórmico^d Calculado com base na porcentagem de área, utilizando como área total o conteúdo de antocianinas monoméricas (Tabela 1)

EF – extrato funcional; cyd 3-glu – cianidina 3-glucosídeo

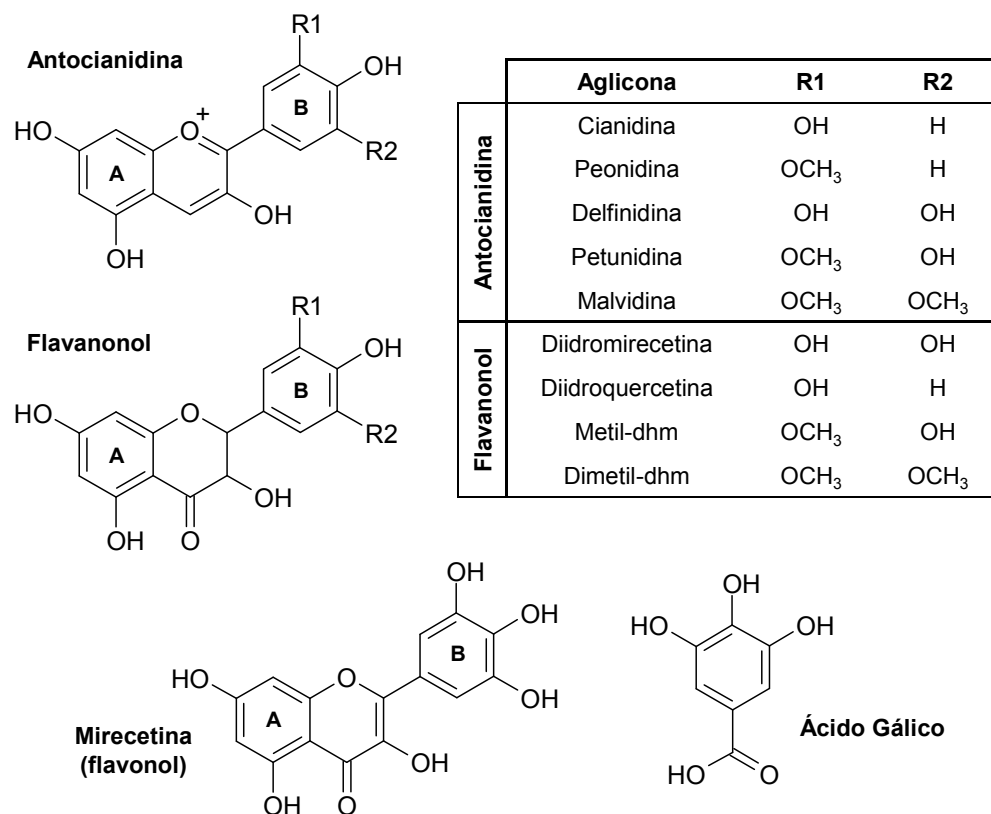


Figura 2. Estruturas das agliconas dos compostos fenólicos encontrados em jambolão. (dhm – diidromirecetina)

O perfil de antocianinas de jambolão foi marcado pela presença de diglucosídeos de diferentes agliconas. Cinco das seis agliconas mais comumente encontradas em alimentos foram identificadas em jambolão: delfinidina (dpn, m/z a 303), cianidina (cyd, m/z a 287), petunidina (ptd, m/z a 317), peonidina (pnd, m/z a 301) e malvidina (mvd, m/z a 331). A identificação de cyd 3-glucosídeo, cyd 3,5-diglucosídeo, mvd 3-glucosídeo e mvd 3,5-diglucosídeo foi confirmada por meio de co-cromatografia com os respectivos padrões. Os picos 1 a 5 foram identificados como 3,5-diglucosídeos dessas antocianinas, enquanto que o pico 4 apresentou uma mistura de duas antocianinas. Uma foi identificada como pnd 3,5-diglucosídeo (pico 4a) com $[M]^+$ a m/z 625, e fragmentos de MS/MS a m/z 463 $[M-162]^+$ e 301 $[M-162-162]^+$ e a outra caracterizada como um monoglucosídeo de

delfinidina (pico 4b) com $[M]^+$ a m/z 465, e fragmento de MS/MS a m/z 303 $[M-162]^+$, provavelmente *dpn* 3-glucosídeo, considerando que a maior parte das antocianinas encontradas naturalmente em alimentos estão pelo menos glicosiladas na posição 3 (Strack & Wray, 1994; Mercadante & Bobbio, 2008).

No pico 6 também foram detectadas duas antocianinas. A presença de delfinidina acetil-diglicosídeo (pico 6a) junto com cianidina 3-glucosídeo (pico 6b) foi verificada por meio dos diferentes íons moleculares. O $[M]^+$ com m/z a 669, deu origem após o MS/MS aos fragmentos com m/z a 507 $[M-162]^+$, 465 $[M-204]^+$ e 303 $[M-162-204]^+$ (Tabela 2). Neste caso, as perdas de 162 u e 204 u correspondem, respectivamente, a uma unidade de hexose e uma unidade de hexose acetilada (162 + 42 u) (Cuyckens & Claeys, 2004) e o fragmento a m/z 303 é característico da aglicona delfinidina. Além disso, a ordem de eluição em relação à *dpn* 3,5-diglicosídeo está coerente com o que se espera para análise em fase reversa, ou seja, que a antocianina acilada apresente tempo de retenção maior que a antocianina correspondente não acilada (Giusti *et al.*, 1999; Wu & Prior, 2005). A identificação de cianidina 3-glucosídeo no pico 6 foi confirmada por co-cromatografia com padrão.

Todas as antocianinas encontradas em jambolão, incluindo cianidina 3-glucosídeo (pico 6b), petunidina 3-glucosídeo (pico 7) e malvidina 3-glucosídeo (pico 8), apresentaram íons moleculares e fragmentos característicos, sendo possível diferenciar as agliconas pelo fato destes compostos apresentarem massas moleculares diferentes, conseqüentemente m/z diferentes (Tabela 2). Para todas as antocianinas identificadas, com exceção da delfinidina acetil-diglicosídeo (pico 6a), as perdas sempre foram de 162 u (Tabela 2), o que corresponde a perda de uma unidade de hexose, sendo que neste caso, essas hexoses foram identificadas como glucoses. Cabe ressaltar que glucose foi o único monossacarídeo encontrado por Veigas *et al.* (2007) após hidrólise ácida de um extrato antociânico obtido a partir de frutos de *Syzygium cumini*, sendo que o hidrolisado foi analisado por meio de cromatografia em papel e espectrometria de massas (ESI-MS).

No caso das antocianinas diglicosiladas (picos 1, 2, 3, 4a, 5 e 6a), o fato de serem observados dois fragmentos, derivados de duas perdas consecutivas de 162 u, em vez de um fragmento decorrente de uma perda de 324 u, indica que essas antocianinas apresentam duas hexoses glicosiladas em posições diferentes (provavelmente em 3 e 5), ao invés de um dissacarídeo na posição 3, cuja perda seria de 324 u, como já relatado em trabalhos anteriores (De Rosso *et al.*, 2008; Giusti *et al.*, 1999; Wu & Prior, 2005).

As principais antocianinas encontradas em jambolão foram delphinidina 3,5 diglucosídeo (45 %), petunidina 3,5-diglucosídeo (32 %) e malvidina 3,5-diglucosídeo (15 %). Esses resultados estão coerentes com aqueles relatados em estudos anteriores com frutos de jambolão, onde as principais antocianinas foram identificadas como 3,5-diglucosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina, em proporções de 23-33 %, 32-35 % e 21-38 %, respectivamente (Brito *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a; Veigas *et al.*, 2007). Além dessas antocianinas, Brito *et al.* (2007) e Li *et al.* (2009a,b) também identificaram 3,5-diglucosídeos de cianidina e peonidina. Em todos os trabalhos citados a identificação de antocianinas baseou-se, entre outras informações, em dados obtidos por espectrometria de massas, sendo que no estudo relatado por Li *et al.* (2009b) a identificação das antocianinas foi confirmada por meio de ressonância nuclear magnética (NMR).

A ocorrência de diferentes agliconas com o mesmo padrão de glicosilação (3-O- β -glucopiranosídeo de delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina), confirmada por MS e NMR, foi relatada em frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora*), planta que também pertence à família MYRTACEAE (Kuskoski *et al.*, 2003). Por outro lado, em outras frutas da mesma família, tais como camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Zanatta *et al.*, 2005), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) (Reynertson *et al.*, 2006) e pitanga (*Eugenia uniflora*) (Einbond *et al.*, 2004), as antocianinas identificadas foram cianidina 3-glucosídeo e delphinidina 3-glucosídeo, e em *Eugenia myrtifolia* foi encontrada uma antocianina apenas, identificada como malvidina 3,5-diglucosídeo (Longo *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos apresentados na Tabela 3, referentes aos cromatogramas mostrados na Figura 3, foram identificados principalmente pelas características apresentadas nos espectros de massas, sendo que a ionização nos modos positivo e negativo forneceu informações complementares, como por exemplo, nos casos em que a molécula protonada ($[M+H]^+$) não foi detectada no modo positivo (apenas o aduto com sódio, $[M+Na]^+$), onde a ionização no modo negativo, com a presença da molécula desprotonada ($[M-H]^-$), permitiu a confirmação da massa molecular do composto.

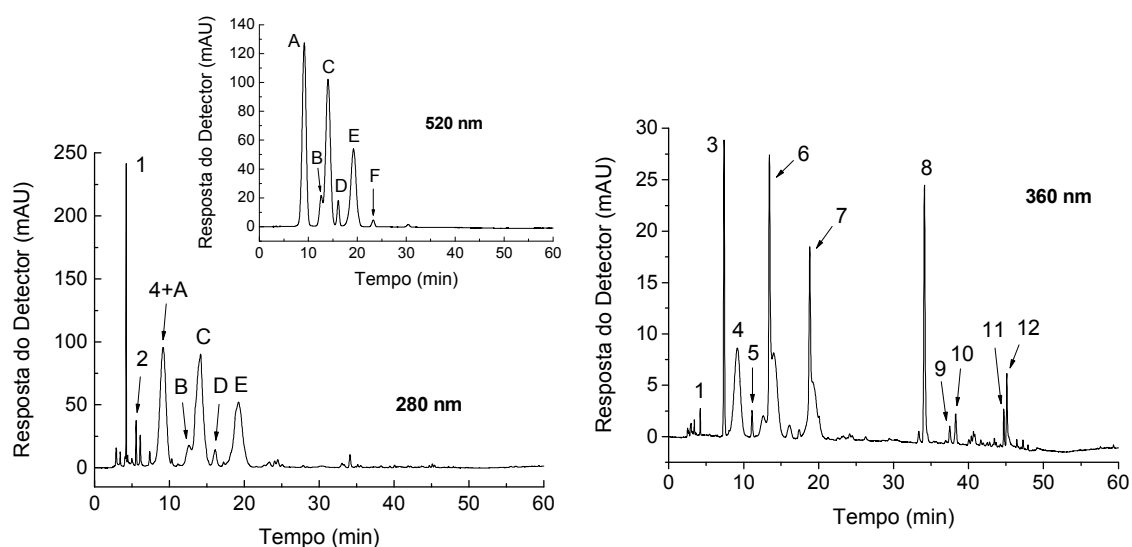


Figura 3. Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, de compostos fenólicos de jambolão. Picos de 1 a 12 identificados de acordo com a Tabela 3. Os picos de A a F referem-se, respectivamente, às antocianinas: dpn 3,5-diglicosídeo, cyd 3,5-diglicosídeo, ptd 3,5-diglicosídeo, dpn 3-glucosídeo, mvd 3,5-diglicosídeo, ptd 3-glucosídeo. Condições cromatográficas: ver texto.

Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas de compostos fenólicos não antocianínicos de jambolão, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS.

Pico ^a	Composto (Classe)	t _R (min) ^b	λ _{máx} ^b (nm)	[M+H] ⁺ /[M+Na] ⁺ (m/z)	MS/MS em ESI ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS em ESI ⁻ (m/z)
1	Éster de galoil-glucose (Ác.fenólico)	4,2	278	n.d. ^c /355	293, 251, 263, 233, 185	331	271, 241, 211, 169[M-H-162] ⁻ , 125
2	Ácido gálico (Ác.fenólico)	5,5	271	n.d.	153[M+H-18] ⁺ ^d , 125	169 ^d	125 ^d
3	Diidromirecetina diglucosídeo (Flavonol)	7,4	336	645/667	483 ^d / 505[M+Na-162] ⁺ , 487,343[M+Na-162-162] ⁺ , 325	643	481[M-H-162] ⁻ , 463, 355, 319[M-H-162-162] ⁻ , 301
4	Não identificado	9,2	340	n.d.	n.d.	643	505, 481, 463, 355, 301, 283
5	Dihidroquetcetina diglucosídeo (Flavonol)	11,1	337	n.d./651	489[M+Na-162] ⁺ , 471,	627	465[M-H-162] ⁻ , 303[M-H-162-162] ⁻ , 285
6	Metil-diidromirecetina diglucosídeo (Flavonol)	13,4	338	n.d./681	327[M+Na-162-162] ⁺ , 309 663, 519[M+Na-162] ⁺ , 501,	657	495[M-H-162] ⁻ , 477, 333[M-H-162-162] ⁻ , 315
7	Dimetil-diidromirecetina diglucosídeo (Flavonol)	18,8	338	n.d./695	677, 533[M+Na-162] ⁺ , 515, 371[M+Na-162-162] ⁺ , 353	671	509[M-H-162] ⁻ , 371, 347[M-H- 162-162] ⁻ , 329, 261
8	Mirecetina glucosídeo (Flavonol)	34,1	355	481/503	319[M+H-162] ⁺ / 341[M+Na-162] ⁺ , 185	479	317[M-H-162] ⁻
9	Mirecetina pentosídeo (Flavonol)	37,5	355	n.d./n.d.	319 ^d , 285, 273, 245, 153	449	317[M-H-132] ⁻
10	Mirecetina ramnosídeo (Flavonol)	38,3	349	n.d./n.d.	319 ^d , 301, 273, 245, 165, 153	463	317[M-H-146] ⁻
11	Mirecetina acetil-ramnosídeo (Flavonol)	44,7	348	n.d./n.d.	319, 273, 245, 165, 153	505	317[M-H-188] ⁻
12	Mirecetina (Flavonol)	45,1	371	319/n.d.	301, 273, 245, 217, 165, 153	317	271, 179, 151

^a Picos numerados de acordo com a Figura 2; ^b Gradiente linear de água/acetoneitrila, ambas com 2 %_{v/v} de ácido fórmico; ^c n.d.: não detectado;

^d fragmentos detectados somente em MS (*in source*)

A identificação do ácido gálico (pico 2) baseou-se nas características dos espectros UV-visível e de massas (Tabela 3) comparados com dados da literatura (Cuyckens & Claeys, 2004; Nuengchamnong & Ingkaninan, 2009; Sakakibara et al., 2003), sendo confirmada por co-cromatografia. Esse ácido fenólico apresentou uma banda de absorção com máximo em 271 nm, que é o $\lambda_{\text{máx}}$ característico dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico. Além disso, o espectro de massas, obtido em ESI+, com fragmento em m/z 153, que corresponde à perda de uma molécula de água (18 u) a partir da molécula protonada (m/z 171), em associação com o espectro obtido em ESI-, onde foi possível detectar $[M-H]^-$ a m/z 169, contribuíram para a identificação desse ácido, uma vez que o padrão analisado nas mesmas condições apresentou as mesmas características na análise por espectrometria de massas (dados não mostrados).

O pico 1 foi tentativamente identificado como éster de galoil-glucose com base na ordem de eluição em fase reversa em relação ao ácido gálico na forma livre, considerando os dados obtidos por meio da ionização no modo negativo, onde foi detectado $[M-H]^-$ com m/z a 331, cujo espectro de MS/MS mostrou uma perda de 162 u, equivalente à eliminação de uma unidade de hexose, formando o íon fragmento com m/z 169 que corresponde ao ácido gálico. A análise em ESI+ confirma a massa molecular do composto ao apresentar o íon com m/z 355 que corresponde ao aduto com sódio ($[M+Na]^+$). Além disso, esse composto apresentou banda máxima de absorção no UV-visível a 278 nm característica dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico. Convém mencionar que esse éster de galoil-glucose (pico 1) apresentou o mesmo padrão de fragmentação em MS/MS apresentado por um éster de galoil-glucose encontrado em “vinho” de jambolão por Nuengchamnong & Ingkaninan (2009).

Em relação aos flavonóis, mirecetina (pico 12) foi identificada por co-cromatografia com padrão, sendo que as características dos espectros de absorção UV-visível ($\lambda_{\text{máx}} = 371$ nm) e de massas ($[M+H]^+$ com m/z a 319, $[M-H]^-$ com m/z a 317, e respectivos fragmentos de MS/MS, Tabela 3) estão de acordo com o esperado para esse flavonol (Fabre et al., 2001; Lin & Harnly, 2007; Rijke et

al., 2006; Sakakibara *et al.*, 2003) e com aquelas obtidas para o padrão analisado nas mesmas condições (dados não mostrados).

Os picos 8, 9, 10 e 11 foram identificados como mirecetina glucosídeo, mirecetina pentosídeo, mirecetina ramnosídeo e mirecetina acetil-ramnosídeo, respectivamente, considerando as características de ordem de eluição, bem como dos espectros UV-visível e de massas. É esperado que a ordem de eluição em fase reversa para uma mesma aglicona seja hexosídeo < pentosídeo < deoxihexosídeo, e que os derivados acilados eluam depois dos respectivos flavonoides não acilados (Lin & Harnly, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Vvedenskaya *et al.*, 2004). Além disso, o $\lambda_{\text{máx}}$ em 349-355 nm, cerca de 20 nm abaixo do $\lambda_{\text{máx}}$ da mirecetina (371 nm), indica a ocorrência do efeito hipsocrômico típico em flavonóis glicosilados em relação à respectiva aglicona (Lin & Harnly, 2007; Sakakibara *et al.*, 2003). O espectro de massas indica a presença da aglicona a m/z 319 (ESI+) e a m/z 317 (ESI-), que corresponde à mirecetina. Cabe ressaltar que estes íons (m/z a 319 e m/z a 317) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação em MS/MS (fragmentos com m/z a 301, 273, 245, 165 e 153) apresentado pela mirecetina. A posição C3 é a localização mais provável do glicosídeo nestes quatro flavonoides, já que a hidroxila do carbono 3 é a mais favorável para glicosilação de flavonóis (Cuyckens & Claeys, 2004). No caso da mirecetina glucosídeo (pico 8), a perda de 162 u, tanto no modo positivo, como no modo negativo, indica a presença de uma hexose na molécula. Já no caso do pico 9 (mirecetina pentosídeo), a perda de 132 u permitiu identificar que o açúcar presente na molécula é uma pentose. No entanto, a análise por espectrometria de massas, por si só, não permite distinguir se o açúcar é uma xilose ou uma arabinose, por exemplo, que são as pentoses mais comumente encontradas como glicosídeos em frutas. Para mirecetina ramnosídeo (pico 10), a perda de 146 u a partir de $[M-H]^-$ (m/z a 463) é característico de uma unidade de deoxihexose, sendo que ramnose é o único monossacarídeo deste tipo encontrado em flavonoides glicosilados de frutas. Por fim, o espectro de MS/MS da mirecetina acetil-ramnosídeo (pico 11) apresentou uma perda de 188 u, que corresponde a

uma unidade de ramnose acetilada (146 + 42 u) (Cuyckens & Claeys, 2004; Mahmoud *et al.*, 2001).

Em relação aos flavanonóis, considerando as vias de biossíntese dos flavonoides de acordo com Heller & Forkmann (1994), Figura 4, as agliconas com m/z a 321 (ESI+, pico 3) e m/z a 305 (ESI+, pico 5), foram identificadas como diidromirecetina e diidroquercetina, respectivamente, uma vez que esses flavanonóis são precursores da mirecetina (pico 12). Considerando ainda que flavonoides simples com uma hidroxila no anel B (Figura 2) podem ser modificados durante a biossíntese, por meio de reações de hidroxilação e metilação (Heller & Forkmann, 1994), as agliconas com m/z a 335 (ESI+, pico 6) e com m/z a 349 (ESI+, pico 7) foram identificados como derivados metilado e dimetilado, respectivamente, da diidromirecetina diglucosídeo (pico 3), Figura 2. Assim como nas antocianinas diglucosiladas, no caso desses quatro flavonoides, a ocorrência, nos espectros de MS/MS, de ambos os fragmentos $[M-H-162]^-$ e $[M-162-162]^-$, equivalente a perdas consecutivas de hexoses, sugere a identificação dos mesmos como diglucosídeos com as moléculas de glucose em posições diferentes, provavelmente nos carbonos 3 e 7, uma vez que essas posições são favorecidas na glicosilação de flavanonóis e flavonóis, e a ocorrência de 5-glicosídeo é rara em flavonoides com uma carbonila na posição 4 (Cuyckens & Claeys, 2004).

Em todos os flavonoides onde ocorreram perdas de 162 u (hexose) – éster de galoil-glucose (pico 1), mirecetina glucosídeo (pico 8) e diglucosídeos de didromirecetina (pico 3), didroquercetina (pico 5), metil-diidromirecetina (pico 6) e dimetil-diidromirecetina (pico 7) – foi proposto que essa hexose seja uma glucose devido ao fato desse monossacarídeo ter sido a única hexose encontrada como glicosídeo nas antocianinas identificadas em jambolão, tanto no presente estudo como em estudos relatados anteriormente (Brito *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009a,b; Veigas *et al.*, 2007).

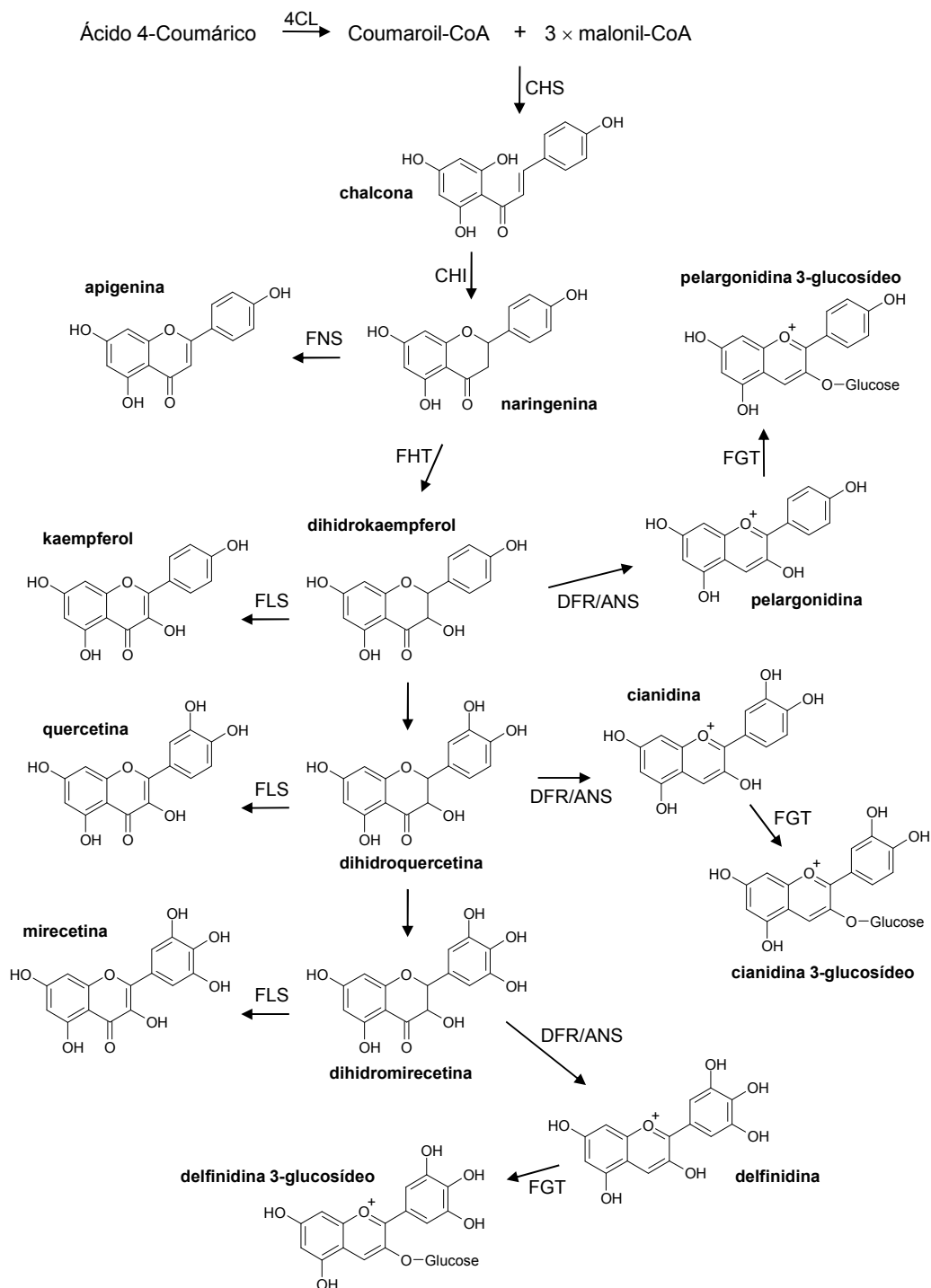


Figura 4. Biossíntese de flavonoides. Enzimas: 4CL – 4-coumarato:CoA ligase; CHS – chalcona sintase; CHI – chalcona isomerase; FNS – flavona sintase; FHT – flavanona 3-hidroxilase; FLS – flavonol sintase; DFR – diidroflavonol 4-redutase; ANS – antocianidina sintase; FGT – flavonoide 3-O-glucosil-transferase. Adaptada de Heller & Forkmann (1994).

Ao comparar agliconas com o mesmo padrão de substituição no anel B, assim como de glicosilação (presença de uma ou duas hexoses), observou-se que, em fase reversa, os flavananóis (picos 3, 5-7) eluem antes das antocianidinas (picos A-F), que por sua vez eluem antes dos flavonóis (picos 8-12).

Não foram encontrados outros trabalhos relatando a identificação de flavonoides não antociânicos em frutos de jambolão. No entanto, o ácido gálico, mirecetina, mirecetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo e mirecetina 3-O-(4"-O-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo, identificados na fruta, foram previamente identificados, por meio de MS e NMR, em folhas de jambolão (Mahmoud *et al.*; 2001).

Em outras plantas pertencentes à família MYRTACEAE, foi relatada a ocorrência de mirecetina e quercetina glicosiladas na posição 3 com um dissacarídeo constituído por xilose e ramnose, bem como quercetina 3-ramnosídeo, em extrato aquoso obtido de *Eugenia jambos* (Constant *et al.*, 1997). Enquanto que em frutos de jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*) foram identificados, entre outros compostos fenólicos, mirecetina 3-ramnosídeo, quercetina e seus derivados 3-glucosídeo, 7-glucosídeo, 3-ramnosídeo e 3-rutinosídeo (rutina), bem como os ácidos gálico, O-coumárico e elágico (Reynertson *et al.*, 2006).

3.3. Composição de carotenoides

Os carotenoides encontrados em jambolão foram identificados com base nas informações obtidas a partir da ordem de eluição em coluna C₃₀ e das características dos espectros de absorção UV-visível e de massas (Tabela 4), comparando com padrões e dados da literatura (Britton *et al.*, 2004; Dachtler *et al.*, 2001; De Rosso & Mercadante, 2007a,b; Strohschein *et al.*, 1999). A análise por MS/MS permitiu a confirmação da molécula protonada dos picos identificados por meio da presença de fragmentos característicos da cadeia poliênica e grupos funcionais dos carotenoides.

Tabela 4. Características cromatográficas e espectroscópicas, e teores de carotenoides de jambolão, obtidos por HPLC-DAD-MS/MS.

Pico ^a	Composto	t _R (min)	λ _{máx} (nm) ^b	%III/II	%A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	Íons fragmentos obtidos em MS/MS (m/z)	μg/100 g
1	cis-neoxantina ou cis-violaxantina	7,9	411, 435, 463	n.c. ^c	n.c.	601	583[M+H-18] ⁺ , 565[M+H-18] ⁺ , 547[M+H-18-18] ⁺ , 221	0,6 ± 0,0
2	cis-luteína	10,1	328, 413, 439, 465	33	n.c.	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 495[M+H-18-56] ⁺	1,3 ± 0,1
3	cis-luteína	11,1	328, 413, 438, 465	33	n.c.	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 495[M+H-18-56] ⁺	0,7 ± 0,1
4	all-trans-luteína	12,0	420, 444, 472	66	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 495[M+H-18-56] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺	39,0 ± 2,2
5	all-trans-zeaxantina	14,1	423, 450, 476	25	0	569	551[M+H-18] ⁺ , 533[M+H-18-18] ⁺ , 477[M+H-92] ⁺	1,7 ± 0,0
6	fitoeno	18,7	272, 285, 294	0	0	545	489, 435, 395, 339[M-205] ⁺	5,6 ± 0,9
7	all-trans-β-criptoxantina	22,7	424, 451, 477	25	0	553	535[M+H-18] ⁺ , 495	0,3 ± 0,1
8	fitoflueno	23,9	329, 347, 366	n.c.	n.c.	543	461, 406[M+H-137] ⁺ , 337[M-205] ⁺	2,9 ± 0,0
9	15-cis-β-caroteno	25,7	420, 449, 472	n.c.	n.c.	537	444[M-92] ⁺	3,1 ± 0,1
10	13-cis-β-caroteno	27,0	335, 420, 444, 470	17	41	537	444[M-92] ⁺	3,8 ± 0,0
11	all-trans-α-caroteno	29,3	420, 447, 472	n.c.	0	537	481[M+H-56] ⁺ , 444[M-92] ⁺	2,7 ± 0,0
12	all-trans-β-caroteno	33,5	425, 451, 478	27	0	537	444[M-92] ⁺	22,7 ± 1,6
13	9-cis-β-caroteno	35,7	337, 420, 447, 472	25	4	537	444[M-92] ⁺	4,9 ± 0,2

^a Picos numerados de acordo com a Figura 3; ^b Gradiente linear de metanol/MTBE; ^c n.c.: não calculado

De acordo com os cromatogramas mostrados na Figura 5 e os dados apresentados na Tabela 4, observa-se que o perfil de carotenoides de jambolão é marcado pela presença de *all-trans*-luteína (pico 4), representando 43,7 % do total, e *all-trans*- β -caroteno (pico 12), correspondendo a 25,4 % do total de carotenoides, e seus respectivos isômeros *cis* (picos 2 e 3, isômeros de luteína, e picos 9, 10 e 13, isômeros de β -caroteno).

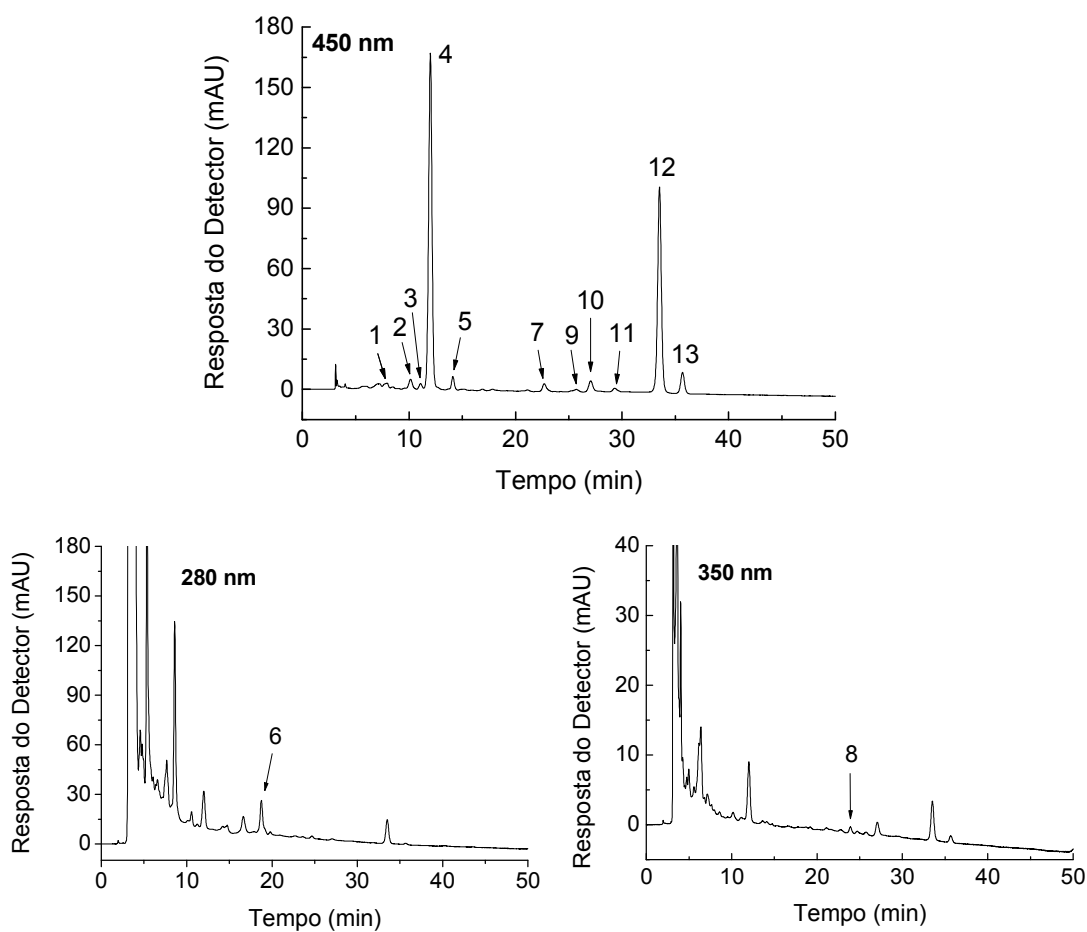


Figura 5. Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, dos carotenoides de jambolão. Picos identificados de acordo com a Tabela 4. Condições cromatográficas: ver texto.

All-*trans*-luteína e all-*trans*- β -caroteno apresentaram espectros de absorção UV-visível e de massas característicos desses compostos (Tabela 4), quando comparados com padrões e dados da literatura (Britton *et al.*, 2004; Dachtler *et al.*, 2001; De Rosso & Mercadante, 2007a,b). Quando comparada ao β -caroteno, a luteína apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ a cerca de 6 nm menor, e maior estrutura fina espectral (%III/II), o que está de acordo com o fato do β -caroteno possuir uma ligação dupla conjugada (c.d.b.) a mais, sendo esta c.d.b. localizada em anel β (Britton, 1995). Além disso, as moléculas protonadas ($[M+H]^+$) em m/z 569, para all-*trans*-luteína, e em m/z 537, para all-*trans*- β -caroteno, com perdas de 92 u (perda de tolueno) em ambos os casos e de 56 u (perda de xileno) no caso da luteína contribuem para a identificação desses carotenoides (De Rosso & Mercadante, 2007a), que foram confirmados por co-cromatografia com padrões.

Os isômeros *cis* de luteína (picos 2 e 3) e de β -caroteno (picos 9, 10 e 13) foram identificados considerando as características do espectro UV-visível, com a ocorrência de efeito hipsocrômico em relação ao isômero all-*trans*, menor estrutura fina espectral e presença do pico “cis”. As características do espectro de massas também foram consideradas, com $[M+H]^+$ a m/z 569 e a m/z 537 para os isômeros de luteína e β -caroteno, respectivamente, e padrão de fragmentação em MS/MS similar ao do respectivo isômero all-*trans* (Tabela 4). No caso dos isômeros de β -caroteno a distinção entre 15-*cis*- (pico 9), 13-*cis*- (pico 10) e 9-*cis*- β -caroteno (pico 12) foi possível considerando ordem de eluição em coluna C_{30} e a diminuição no valor de %III/II e aumento no valor de %A_B/A_{II} conforme a isomerização se aproxima do centro da molécula (De Rosso & Mercadante, 2007a; Strohschein *et al.*, 1999), sendo a identificação confirmada por meio de co-cromatografia com padrões. Enquanto que no caso dos isômeros de luteína, não foi possível distinguir entre 13-, 13'-, 15- e 15'-*cis*-luteína, pois não foi possível calcular a %A_B/A_{II}. Descartou-se a possibilidade da presença de 9- ou 9'-*cis*-luteína porque, em coluna C_{30} , este isômero elui após o isômero all-*trans*, assim como ocorreu com β -caroteno.

Apesar de *all-trans*-luteína (pico 4) e *all-trans*-zeaxantina (pico 5) possuírem a mesma fórmula química ($C_{40}H_{56}O_2$) e, conseqüentemente moléculas protonadas iguais (m/z 569), zeaxantina possui dois anéis β em sua estrutura, enquanto que luteína possui um anel β e um anel ϵ (Figura 6). A presença desse anel ϵ faz com que um dos grupos hidroxílicos esteja em posição alílica em relação à ligação dupla no anel e esta ligação não esteja em conjugação com as ligações duplas da cadeia poliênica, resultando em um cromóforo com 10 c.d.b na luteína, enquanto que na zeaxantina o cromóforo é constituído por 11 c.d.b. Dessa forma, é possível distinguir esses dois carotenoides tanto através do espectro UV-visível como do espectro de massas. Como esperado zeaxantina apresentou valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ superiores àqueles obtidos para luteína e similares aos de *all-trans*- β -caroteno. Essa diferença estrutural entre zeaxantina e luteína, que faz com que estes carotenoides tenham cromóforos diferentes, também proporciona diferenças nas intensidades relativas dos fragmentos obtidos por espectrometria de massas. Assim, o espectro de massas da zeaxantina apresentou $[M+H]^+$ (m/z 569) com maior intensidade em relação ao fragmento em m/z 551 $[M+H-18]^+$, ao contrário do que foi observado para luteína, o que está de acordo com dados relatados por De Rosso & Mercadante (2007a).

Como esperado, *all-trans*- β -criptoxantina (pico 7) apresentou espectro UV-visível com características semelhantes àquelas do espectro UV-visível de *all-trans*- β -caroteno (pico 12), uma vez que esses carotenoides possuem o mesmo cromóforo (Britton *et al.*, 2004). Além disso, a molécula protonada (m/z 553) e os respectivos fragmentos em MS/MS (m/z 535 $[M+H-18]^+$ e m/z 495) obtidos para *all-trans*- β -criptoxantina (Tabela 4) estão de acordo com o esperado considerando a estrutura química desse carotenoide (Figura 6) e coerentes com dados relatados anteriormente (De Rosso & Mercadante, 2007a,b; Faria *et al.*, 2009).

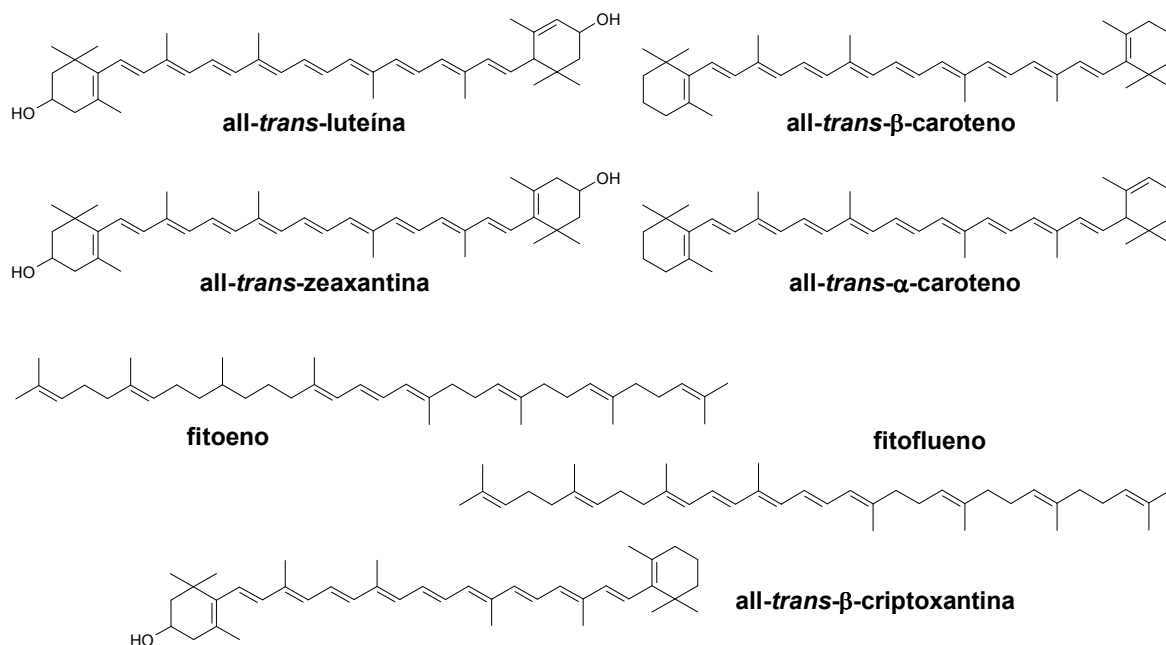


Figura 6. Estruturas de alguns carotenoides encontrados em jambolão.

All-trans-α-caroteno (pico 11) é facilmente diferenciado dos isômeros *cis* do β-caroteno, embora ambos os carotenoides apresentem valores de $\lambda_{\text{máx}}$ muito parecidos, devido ao fato do espectro de absorção UV-visível do *all-trans-α-caroteno* não apresentar pico “cis” ($\%A_{\text{B}}/A_{\text{II}} = 0$) e possuir estrutura fina espectral bastante superior àquela apresentada pelos isômeros de β-caroteno.

A identificação de *all-trans-zeaxantina* (pico 5), *all-trans-β-criptoxantina* (pico 7) e *all-trans-α-caroteno* (pico 11) foi confirmada por meio de co-cromatografia com padrões.

Fitoeno (pico 6) e fitoflueno (pico 8) foram identificados comparando as características apresentadas por esses carotenoides com dados da literatura (Britton *et al.*, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007a e b).

Não foram encontrados outros trabalhos onde tenha sido determinada a composição de carotenoides em jambolão. Considerando outras frutas da família

MYRTACEAE, o perfil de carotenoides de jambolão apresenta semelhanças com camu-camu (*Myrciaria dubia*), onde os principais carotenoides foram identificados como *all-trans*-luteína (45,2-55,0 %) e β -caroteno (13,0-20,5 %) (Zanatta & Mercadante, 2007), sendo, por outro lado, razoavelmente diferente de pitanga (*Eugenia uniflora*) que apresenta licopeno, β -criptoxantina e rubixantina como carotenoides principais (Filho *et al.*, 2008).

3.4. Atividade antirradical ABTS^{•+} e frente ao ¹O₂

A mesma diluição do EF em tampão utilizada para a análise de atividade antirradical ABTS^{•+} foi usada para medir os espectros UV-visível em cada condição de pH (1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0). Esses espectros são apresentados na Figura 7 e as respectivas absorbâncias a 520 nm estão na Tabela 5. Esta tabela também reúne os valores de TEAC e de porcentagem de proteção conferida ao DMA, frente à oxidação por ¹O₂, ambos referentes ao extrato funcional.

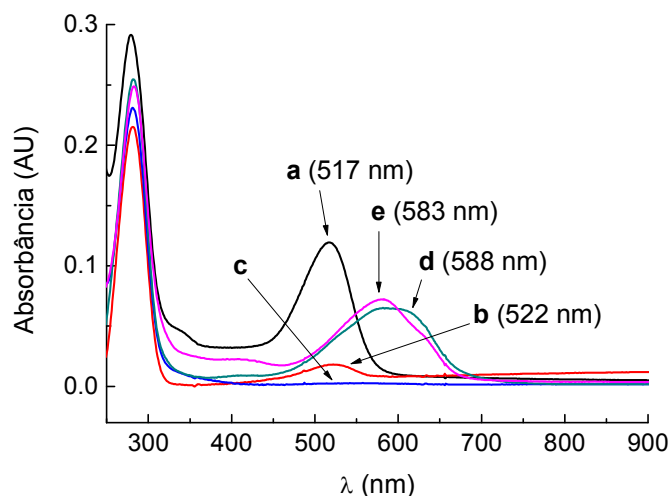


Figura 7. Espectros UV-visível obtidos a partir do extrato funcional (EF) diluído, a uma proporção de 0,35 %_{v/v}, nas soluções: (a) KCl/HCl (0,25 mol/L) com pH 1,0; (b) tampão citrato (0,4 mol/L) com pH 3,0; (c) tampão citrato (0,4 mol/L) com pH 5,0; (d) tampão fosfato (0,4 mol/L) com pH 7,0; (e) tampão borato (0,4 mol/L) com pH 9,0.

Tabela 5. Valores de TEAC, porcentagem de proteção frente ao $^1\text{O}_2$ e absorvância a 520 nm do extrato funcional nas diferentes condições de pH.

Sistema (solução – pH)	Abs_{520nm}	ABTS TEAC_{15min}^a	$^1\text{O}_2$ % Proteção^b
KCl/HCl ^c – pH 1,0	0,1188	4,8 ± 0,6	60,6 ± 4,1
Tampão citrato ou acetato ^{d,e} – pH 3,0	0,0181	5,8 ± 0,2	62,3 ± 1,1
Tampão citrato ^d – pH 5,0	0,0025	12,7 ± 1,1	n.d. ^f
Tampão fosfato ^d – pH 7,0	0,0374	9,7 ± 0,9	n.d.
Tampão borato ^d – pH 9,0	0,0406	11,0 ± 0,6	n.d.

^a $\mu\text{mol Trolox/g}$ fruta;

^b proporção de extrato no meio de reação: 2,45 %_{v/v} (corresponde a 2,1 $\mu\text{g AM/mL}$)

^c 0,25 mol/L; ^d 0,4 mol/L; ^e tampão citrato para ABTS e tampão acetato para $^1\text{O}_2$

^f n.d.: não determinado

Em solução aquosa, uma mistura de diferentes formas das antocianinas estão em equilíbrio químico, cátion flavílium (vermelho), bases quinonoidais (azul), pseudobases carbinol ou hemiacetais (incolor) e chalconas (amarelo claro/incolor). A quantidade relativa de cada forma em equilíbrio varia em função do pH e da estrutura da antocianina (Houbiers *et al.*, 1998). Os espectros UV-visível nas diferentes condições de pH (Figura 7), e os valores de absorvância a 520 nm (região onde a forma de cátion flavílium apresenta maior absorvância) (Tabela 5), demonstram o deslocamento desse equilíbrio. Em pH 1,0 as antocianinas presentes no meio estão predominantemente na forma de cátion flavílium (espectro a, Figura 7), sendo que a proporção dessa forma em pH 3,0 (espectro b, Figura 7) diminui bastante e é praticamente inexistente em pH 5,0. Em pH 5,0, a ausência de banda de absorção na região visível do espectro indica que as moléculas de antocianinas estão, em sua maioria, nas formas incolores de hemiacetais e/ou chalconas, (espectro c, Figura 7 e Tabela 5). Por fim, o deslocamento batocrômico das bandas de absorção em pH 7,0 e 9,0, em relação ao pH 1,0, indica o deslocamento do equilíbrio para a formação das bases

quinonoidais, que apresentam um cromóforo estendido em relação ao cátion flavílium, pelo fato de serem formas desprotonadas do mesmo.

Os valores das constantes de decaimento (k_{DMA} e $k_{\text{DMA+EF}}$), utilizadas para o cálculo da porcentagem de proteção frente ao $^1\text{O}_2$ (Tabela 5), foram obtidos por meio de ajustes exponenciais obtidos para as curvas de decaimento de primeira ordem da absorbância do DMA, a 375 nm, na presença e na ausência de extrato funcional, nas condições de pH 1,0 e 3,0 (Figura 8). Os gráficos da Figura 8 mostram que o decaimento do DMA em pH 3,0 ocorreu mais rapidamente que em pH 1,0, sendo que os valores das porcentagens de proteção conferidos pelo extrato funcional foram similares. Esse comportamento pode ter sido influenciado pelos íons provenientes da solução tampão.

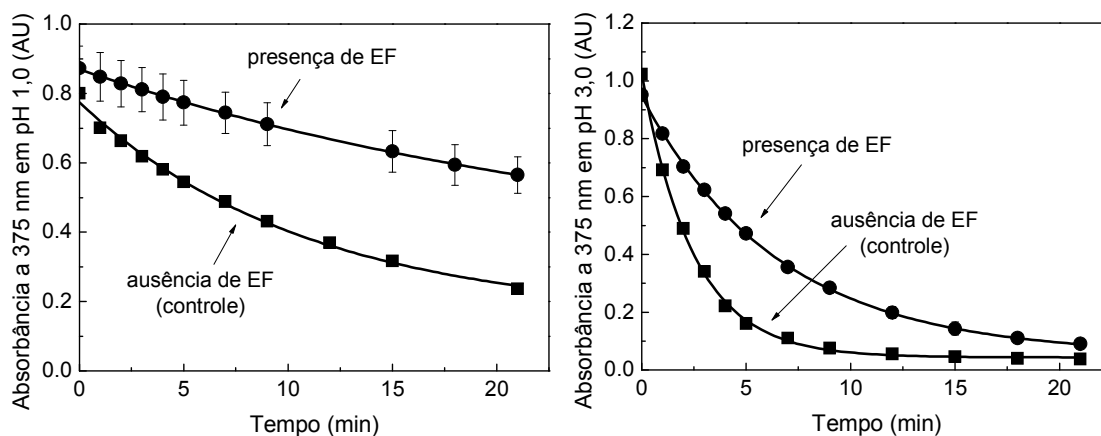


Figura 8. Decaimento da absorbância do DMA, a 375 nm, na presença (●) e na ausência (■) de extrato funcional, nas condições de pH 1,0 (esquerda) e 3,0 (direita).

De acordo com os dados da Tabela 5, observa-se que nas condições de pH 1,0 e 3,0 a atividade antirradical $\text{ABTS}^{*\cdot}$, assim como o efeito protetor frente ao $^1\text{O}_2$, foram muito parecidos. No entanto, em pH 5 o valor de TEAC foi 2,2-2,7 vezes maior, quando comparado aos valores em pH 1,0 e 3,0. Esses resultados

indicam que as formas incolores das antocianinas tendem a ter uma atividade antioxidante maior que a forma de cátion flavílium, considerando que em pH 3,0 uma parte das antocianinas ainda estava na forma de cátion flavílium. Já os valores de TEAC nas condições de pH 7,0 e 9,0 foram similares àquele obtido em pH 5,0, indicando que as formas (hemiacetais e/ou chalconas e bases quinonoidais) das antocianinas presentes nestas condições apresentam atividades parecidas frente ao radical ABTS^{•+}.

Os valores de TEAC obtidos nas condições de pH entre 5,0 e 9,0 (9,7-12,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$ fruta) estão na mesma faixa daquele relatado por Luximon-Ramma *et al.* (2003) para frutos de jambolão (15 $\mu\text{mol Trolox/g}$ fruta), cuja análise de ABTS foi realizada em meio aquoso não tamponado. Os resultados obtidos também foram próximos aos valores de TEAC obtidos para amostras de suco de diferentes cultivares de cereja, que variaram entre 20 e 26 $\mu\text{mol Trolox/g}$ fruta, em meio com pH 7,4 (Blando *et al.*, 2004). Por outro lado, Kapasakalidis *et al.* (2006) relataram que extratos de groselha ricos em antocianinas apresentaram valores de TEAC em torno de 400 $\mu\text{mol Trolox/g}$. No entanto esses resultados foram expressos em base seca e a análise de ABTS foi realizada em meio etanólico.

Como mostrado na Tabela 5, os valores de proteção frente ao $^1\text{O}_2$ obtidos neste estudo foram cerca de 60 % (pH 1,0 e pH 3,0), sendo que a proporção de extrato funcional utilizada nessa análise (2,45 %_{v/v}) era equivalente a uma concentração de antocianinas monoméricas de 2,1 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado corresponde a uma atividade bastante superior àquela apresentada pelas antocianidinas delphinidina e cianidina em um meio com pH 4,5, onde foi necessário entre 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$ dessas antocianidinas para obter uma porcentagem de proteção frente ao $^1\text{O}_2$ próxima a 60 % (Wada *et al.*, 2007). Os resultados obtidos neste estudo também correspondem a uma atividade superior àquela apresentada por amostras de sucos de diferentes frutas, ricas em antocianinas, em meio com pH 7,1. Essas amostras apresentaram porcentagens de proteção frente ao $^1\text{O}_2$ entre 8 % (mirtilo) e 15 % (morango), sendo que a proporção de suco utilizada nas análises foi de 5 %_{v/v} (Wang & Jiao, 2000). Cabe ressaltar que nestes dois

trabalhos o oxigênio singlete foi gerado por meio de reação química, diferente do método fotoquímico empregado neste trabalho.

O aumento da atividade antioxidante com o aumento do valor de pH encontrado neste trabalho está de acordo com os resultados relatados por Vieyra *et al.* (2009), onde as constantes de desativação total de oxigênio singlete pelos flavonoides 3,7-diidroxiflavona (DHF), 7-hidroxi flavanona (HF) e 2',4'-diidroxichalcona (DHC) aumentaram, respectivamente, 5, 6 e 25 vezes em meio básico comparado ao meio neutro. Em meio ácido, essas constantes foram cerca de 20 % menores que em meio neutro, para HF e DHC, e 6 % menor para DHF.

A maior atividade antirradical livre em condições mais próximas a neutralidade pode ser um indicativo de uma boa atividade biológica do extrato funcional em condições fisiológicas (pH 7,4). Essa tendência para uma eficiente atividade biológica também é indicada por resultados relatados anteriormente, onde extratos de frutos de jabolão foram capazes de inibir em 83-94 % a peroxidação lipídica induzida por ferro em sistemas baseados em células de cérebro e fígado de ratos (Veigas *et al.*, 2007), bem como de inibir o crescimento e induzir à apoptose de células de câncer de mama, em estudo *in vitro*, sem apresentar toxicidade para células normais (não cancerosas) (Li *et al.*, 2009a). Além disso, extratos de folhas de jabolão protegeram culturas de linfócitos de sangue humano frente aos danos causados pela radiação gama (Jagetia & Baliga, 2002) e apresentaram efeito antialérgico em ratos, em uma extensão comparável ao efeito do anti-histamínico prometazina (Brito *et al.*, 2007).

Em resumo, os principais compostos bioativos foram identificados na fruta de jabolão, sendo que pela primeira vez a composição de carotenoides e de compostos fenólicos não antociânicos foi relatada. A atividade antirradical livre do extrato funcional de jabolão apresentou variação em função do pH do meio, com tendência ao aumento da atividade em valores maiores de pH. Em relação à proteção frente ao oxigênio singlete, o extrato funcional apresentou características antioxidantes superiores a de outras frutas vermelhas.

Agradecimentos: Os autores agradecem a FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro.

4. Referências Bibliográficas

- Back, S., Enzell, C.R. *Mass Spectrometry*. In: Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhäuser, Basel, p.261-320, 1995.
- Benassi, M.T.; Antunes, A.J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extracts solutions for the determination of vitamin C in vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 31, 507-513, 1988.
- Benherlal, P.S.; Arumughan, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2560-2569, 2007.
- Blando, F.; Gerardi, C.; Nicoletti, I. Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 253-258, 2004.
- Brito, E.S.; Araújo, M.C.P.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9389-9394, 2007.
- Brito, F.A.; Lima, L.A.; Ramos, M.F.S.; Nakamura, M.J.; Cavalher-Machado, S.C.; Siani, A.C.; Henriques, M.G.M.O.; Sampaio, A.L.F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 105-115, 2007.
- Britton, G. *UV/visible spectroscopy*. In: Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhäuser, Basel, p.13-62, 1995.

- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser, Basel, 563p., 2004.
- Constant, H.L.; Slowing, K.; Graham, J.G.; Pezzuto, J.M.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.W. A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis. *Phytochemical Analysis*, 8, 176-180, 1997.
- Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15, 2004.
- Dachtler, M.; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Analytical Chemistry*, 73, 667-674, 2001.
- De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5062-5072, 2007a.
- De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9135-9141, 2007b.
- De Rosso, V.V.; Hillebrand, S.; Montilla, E.C.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 291-299, 2008.
- Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 338-343, 2000.
- Einbond, L.S.; Reynertson, K.A.; Luo, X.-D.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84, 23-28, 2004.

-
- Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 707-715, 2001.
- Faria, A.F.; De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. Carotenoid composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 108-115, 2009.
- Filho, G.L.; De Rosso, V.V.; Meireles, M.A.A.; Rosa, P.T.V.; Oliveira, A.L.; Mercadante, A.Z.; Cabral, F.A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 33-39, 2008.
- Giusti, M.M.; Rodríguez-Saona, L.E.; Griffin, D.; Wrolstad, R.E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4657-4664, 1999.
- Hassimotto, N.M.A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935, 2005.
- Heller, W.; Forkmann, G. *Biosynthesis of flavonoids*. In: *The Flavonoids – Advances in Research since 1986*. Harborne, J. B. (Ed.). Chapman & Hall/CRC, New York, p. 499-535, 1994.
- Houbiers, C.; Lima, J.C.; Maçanita, A.L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of flavylum cation e copigmentation with the z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry*, 102, 3578-3585, 1998.
- Jagetia, G.C.; Baliga, M.S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicology Letters*, 132, 19-25, 2002.

-
- Jurd, L.; Asen, S. The formation of metal and “co-pigment” complexes of cyaniding 3-glucoside. *Phytochemistry*, 5, 1263-1271, 1966.
- Kapasakalidis, P.G.; Rastall, R.A.; Gordon, M.H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4016-4021, 2006.
- Kuskoski, E.M.; Vega, J.M.; Rios, J.J.; Fett, R.; Troncoso, A.M.; Asuero, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5450-5454, 2003.
- Lee, J.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278, 2005.
- Li, L.; Adams, L.S.; Chen, S.; Killian, C.; Ahmed, A.; Seeram, N.P. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57, 826-831, 2009a.
- Li, L.; Zhang, Y.; Seeram, N.P. Structure of anthocyanins from *Eugenia jambolana* fruit. *Natural Product Communications*, 4, 217-219, 2009b.
- Lin, L.-Z.; Harnly, J.M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1084-1096, 2007.
- Loguercio, A.P.; Battistin, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) MYRTACEAE oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. *Revista da FZVA*, 11, 95-106, 2004.

- Longo, L.; Scardino, A.; Vasapollo, G.; Blando, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 329-332, 2007.
- Luximon-Ramma, A.; Bahorun, T.; Crozier, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 496-502, 2003.
- Mahmoud, I.I.; Marzouk, M.S.A.; Moharram, F.A.; El-Gindi, M.R.; Hassan, A.M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*, 58, 1239-1244, 2001.
- Marinova, D.; Ribarova, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 370-374, 2007.
- Mercadante, A.Z.; Bobbio, F.O. *Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.241-276, 2008.
- Metivier, R.P.; Francis, F.J.; Clydesdale, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45, 1099-1100, 1980.
- Nuengchamnong, N.; Ingkaninan, K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 297-302, 2009.
- Ravi, K.; Rajasekaran, S.; Subramanian, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1433-1439, 2005.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.

-
- Reynertson, K.A.; Wallace, A.M.; Adachi, S.; Gil, R.R.; Yang, H.; Basile, M.J.; D'Armiento, J.; Weinstein, I.B.; Kennelly, E.J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69, 1228-1230, 2006.
- Reynertson, K.A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109, 883-890, 2008.
- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63, 2006.
- Rodrigues, C.M.; Montoro, P.; Rinaldo, D.; Piacente, S.; Sannomiya, M.; Pizza, C.; Vilegas, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochemical Analysis*, 19, 17-24, 2008.
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581, 2003.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, 1965.
- Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66, 2003.

-
- Souza, M.C.C.; Benassi, M.T.; Meneghel, R.F.A.; Silva, R.S.S.F. Stability of unpasteurized and refrigerated orange juice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 391-397, 2004.
- Strack, D.; Wray, V. *The Anthocyanins*. In: *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall/CRC, New York, p.1-22, 1994.
- Strohschein, S.; Pursch, M.; Albert, K. Hyphenation of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy for the characterization of β -carotene isomers employing a C₃₀ stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 669-677, 1999.
- Veigas, J.M.; Narayan, M.S.; Laxman, P.M.; Neelwarne, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. *Food Chemistry*, 105, 619-627, 2007.
- Vvedenskaya, I.O.; Rosen, R.T.; Guido, J.E.; Russell, D.J.; Mills, K.A.; Vorsa, N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 188-195, 2004.
- Vieyra, F.E.M.; Boggetti, H.J.; Zampini, I.C.; Ordoñez, R.M.; Isla, M.I.; Alvarez, R.M.S.; De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radical Research*, 43, 553-564, 2009.
- Wada, M.; Kido, H.; Ohyama, K.; Ichibangase, T.; Kishikawa, N.; Ohba, Y.; Nakashima, M.N.; Kuroda, N.; Nakashima, K. Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: evaluation of grape seed, monascus, gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives. *Food Chemistry*, 101, 980-986, 2007.

-
- Wang, S.Y.; Jiao, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5677-5684, 2000.
- Waterman, P.G.; Mole, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 238p., 1994.
- Williams, C.A.; Grayer, R.J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*, 21, 539-573, 2004.
- Wu, X.; Prior, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599, 2005.
- Zanatta, C.F.; Cuevas, E.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9531-9535, 2005.
- Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101, 1526-1532, 2007.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry*, 64, 555-559, 1999.

CAPÍTULO V

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ANTOCIANINA CIANIDINA 3- GLUCOSÍDEO EM SISTEMA MIMETIZADOR DE MEMBRANAS

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista

Langmuir

RESUMO

Os lipossomas têm sido utilizados como sistemas mimetizadores de membranas para avaliação da atividade de diversos compostos tais como a atividade inibidora da oxidação lipídica. Uma das vantagens desse sistema é a semelhança de sua estrutura com a porção lipídica de membranas celulares. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de cianidina 3-glucosídeo incorporada em lipossomas unilamelares grandes (LUV) obtidos em duas condições diferentes de pH: 3,1 e 7,4. Os LUVs foram preparados por meio de extrusão, utilizando membranas de policarbonato de 100 nm de poro. A oxidação lipídica foi induzida por AAPH (diidrocloreto de α,α' -azodiisobutiramidina) a 37 °C, e acompanhada pela perda de fluorescência do lipídio C₁₁-BODIPY (ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diazas-indaceno-3-undecanoico), que é um análogo de ácido graxo. Observou-se que em lipossomas, as formas de cianidina 3-glucosídeo presentes no meio com pH 7,4 (hemiacetais e/ou chalconas e bases quinonoidais), onde a concentração de antioxidante necessária para que se obtivesse 50 % de proteção (EC₅₀) foi de $9,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$, apresentaram uma atividade 2,6 vezes maior que as formas presentes no meio com pH 3,1 (maior proporção das formas cátion flavílium e hemiacetais), com EC₅₀ = $23,6 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$. Independentemente do pH, a inibição da oxidação foi dose-dependente da concentração de antocianina.

Palavras-chave: atividade antioxidante, cianidina 3-glucosídeo, lipossomas, AAPH, fluorescência

1. Introdução

Antocianinas são pigmentos naturais que pertencem à classe dos flavonoides e estão amplamente distribuídas em vegetais, frutas, grãos e flores. A unidade estrutural desses pigmentos é o cátion flavílium com 15 carbonos, que se encontra normalmente glicosilado (Strack & Wray, 1994). Esses pigmentos apresentam coloração entre vermelho e azul, dependendo da estrutura da antocianina, bem como das condições do ambiente onde estão presentes, tais como pH e possibilidade de interação com outros compostos (Brouillard, 1982; Heredia *et al.*, 1998). Em solução aquosa, quatro formas de antocianina podem existir em equilíbrio químico: cátion flavílium (vermelho), bases quinonoidais (azul), pseudobases carbinol ou hemiacetais (incolor) e chalconas (amarelo claro/incolor). A quantidade relativa de cada forma em equilíbrio varia em função do pH e da estrutura da antocianina, sendo dependente dos valores das constantes de equilíbrio de hidratação, K_h , e de desprotonação, K_a (Houbiers *et al.*, 1998; Mercadante & Bobbio, 2008).

A ingestão de frutas e vegetais contendo antioxidantes polifenólicos naturais tem sido correlacionada com a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, tais como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (Cooke *et al.*, 2005; Lila, 2004; Seeram, 2008). A maioria dos compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, destaca-se pela capacidade de desativar radicais livres, doando um átomo de hidrogênio ou transferindo um elétron. Outro mecanismo de ação antioxidante deste tipo de molécula é através da quelação de metais bivalentes capazes de produzir espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1996). As antocianinas têm apresentado boa eficiência como desativadores de radicais e espécies neutras, como ânion superóxido (Yamasaki *et al.*, 1996), radical peroxila (Wang *et al.*, 1997), peróxido de hidrogênio (Youdim *et al.*, 2000) e oxigênio singlete (De Rosso *et al.*, 2008). Entretanto, estes estudos foram conduzidos em soluções homogêneas, muito diferentes das condições encontradas em alimentos e células.

Os lipossomas são agregados formados a partir de dispersões aquosas de lipídios polares com propriedades anfifílicas, que tendem a produzir estruturas bimoleculares similares àsquelas presentes nas células, com uma camada simples (SUV, *small unilamellar vesicle*, ou LUV, *large unilamellar vesicle*) ou múltiplas camadas de membranas (MLV, *multilamellar vesicle*) (Lasic, 1998).

A estrutura em bicamada semelhante à fração lipídica de membranas celulares tem estimulado o uso de lipossomas como sistemas mimetizadores de membrana para avaliar a proteção por antioxidante (Cantrell *et al.*, 2003; Graversen *et al.*, 2008; Roberts & Gordon, 2003; Zhang *et al.*, 2006). O uso desse sistema como método para avaliação de propriedades antioxidantes permite a avaliação tanto de compostos lipofílicos, presentes na membrana, como hidrofílicos, presentes na fase aquosa dos lipossomas (Roberts & Gordon, 2003).

Especificamente no caso de antocianinas, os lipossomas têm sido empregados tanto na avaliação da atividade antioxidante de extratos (Faria *et al.*, 2005; Hassimotto *et al.*, 2005; Heinonen *et al.*, 1998) como de padrões (Hassimotto *et al.*, 2005; Satué-Gracia *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1994; Viljanen *et al.*; 2004a). Cabe ressaltar que na maioria desses estudos foram utilizados lipossomas do tipo SUV preparados em pH entre 6,6 e 7,4, com exceção de um trabalho que utilizou LUV para avaliar extratos de mirtilo (Faria *et al.*, 2005) e outro que foi realizado em meio não tamponado com pH inicial de 4,6 (Satué-Gracia *et al.*, 1997). Além disso, com exceção dos trabalhos relatados por Viljanen *et al.* (2004a,b), esses estudos foram realizados por meio da adição das antocianinas ou extratos em suspensões de lipossomas previamente preparados. Entretanto, são esperadas diferenças na atividade antioxidante dos compostos quando estes são incorporados nos lipossomas durante o preparo dos mesmos ou são misturados aos lipossomas já preparados (Zhang *et al.*, 2006).

Considerando o exposto, para simular sistemas reais, como membranas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante da cianidina 3-glucosídeo incorporada em lipossomas unilamelares grandes (LUV), preparados

em duas condições diferentes de pH (3,1 e 7,4), submetidos a oxidação iniciada por radicais livres.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Fosfatidilcolina de soja (PM \cong 776 g/mol), com pureza de 99 %, e diidrocloreto de α,α' -azodiisobutiramidina (AAPH, PM = 271,19 g/mol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Alemanha). O lipídio fluorescente ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanoico (C₁₁-BODIPY, PM = 504,43 g/mol) foi adquirido da Molecular Probes, Invitrogen (Eugene, EUA). Cianidina 3-glucosídeo (cyd 3-glu, PM = 502,5 g/mol) foi adquirida da Extrasynthèse (Genay, França). Sacarose p.a. foi adquirida da Labsynth (Diadema, Brasil).

Clorofórmio p.a. foi adquirido da Merk (Darmstadt, Alemanha) e os demais solventes, ácidos e sais grau p.a. utilizados foram adquiridos da Labsynth. A água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA).

2.2. Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados em dois sistemas diferentes, sendo um em pH 3,1 (solução tampão citrato 12 mmol/L) e outro em pH 7,4 (solução tampão fosfato salino 12 mmol/L). Em cada condição de pH foram preparados lipossomas sem antocianina, denominados como lipossomas controle (LC), e lipossomas com três concentrações diferentes de cianidina 3-glucosídeo, de acordo com a Tabela 1. Para a adição de antocianina nos lipossomas, o padrão de cianidina 3-glucosídeo foi dissolvido em metanol com 1 % de HCl e a concentração desta solução foi determinada por meio de leitura em um espectrofotômetro Agilent 8453 (Santa Clara, EUA) e calculada através da Lei de Beer, considerando $\varepsilon = 34300$ L/mol.cm (Francis, 1982).

Tabela 1. Condições de pH e concentrações de cianidina 3-glucosídeo utilizados no preparo dos lipossomas

pH	[cyd 3-glu] ^a ($\mu\text{mol/L}$)	Abreviatura
3,1	0	LC-pH3,1
	4,5	C3G-1-pH3,1
	9,3	C3G-2-pH3,1
	18,1	C3G-3-pH3,1
7,4	0	LC-pH7,4
	4,5	C3G-1-pH7,4
	9,3	C3G-2-pH7,4
	18,1	C3G-3-pH7,4

^a concentração na suspensão lipídica, calculada com base na concentração da solução de cyd 3-glucosídeo em metanol com 1 % HCl.

Para o preparo dos lipossomas, fosfatidilcolina e o lipídio fluorescente (C₁₁-BODIPY) foram dissolvidos em clorofórmio e o solvente foi evaporado, sob fluxo de N₂, de forma a obter uma camada de lipídio distribuída na parede do recipiente. Com exceção dos lipossomas controle (LC), após a evaporação do clorofórmio foi adicionada uma alíquota da solução 1% de HCl em MeOH de cianidina 3-glucosídeo de forma a obter a concentração desejada desta antocianina e, em seguida, o solvente foi evaporado da mesma forma que o clorofórmio. Após a evaporação completa do solvente, todos os tubos foram mantidos sob vácuo à temperatura – 98 °C durante uma noite para retirada de eventual solvente residual. Na sequência, foi adicionada sacarose a todos os tubos em uma proporção 2:1 sacarose/fosfatidilcolina, e em seguida, os lipídios foram hidratados com a solução tampão apropriada para o pH desejado. As concentrações finais de fosfatidilcolina e de C₁₁-BODOPY na solução tampão de hidratação foram de 5,8 mmol/L e 5 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. A hidratação foi realizada por meio de agitação em

vórtex, por 5 min, seguida de agitação em banho de ultrassom, por 2 min, obtendo-se assim lipossomas multilamelares (MLV). Logo após a hidratação, foram realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento e, em seguida, os MLV foram submetidos à extrusão através da passagem da suspensão lipídica por 21 vezes em uma mini-extrusora Avanti Polar Lipids (Alabaster, EUA), utilizando membranas de policarbonato de 100 nm de poro (Whatman, GE Healthcare, Piscataway, EUA), de forma a obter os lipossomas unilamelares LUV (Zhang *et al.*, 2006).

2.3. Monitoramento da oxidação lipídica

Para avaliar a oxidação lipídica, 1 mL da suspensão de LUV foi adicionada em 0,84 mL da solução tampão utilizada no preparo dos lipossomas e mantido sob agitação leve, a 37 °C por 5 min, no espectrofluorímetro. Em seguida, 0,16 mL de solução aquosa de AAPH (concentração final de 40 mmol/L), iniciador de radicais livres, foi adicionada ao sistema. Imediatamente após a adição de AAPH, iniciou-se o acompanhamento da oxidação lipídica por meio de medidas da intensidade de fluorescência do C₁₁-BODIPY, utilizando-se comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) de 540 nm e de emissão (λ_{em}) de 596 nm, e fendas de excitação e de emissão de 2,5 e 5 nm, respectivamente, em um espectrofluorímetro CaryEclipse Varian (Palo Alto, EUA). A oxidação lipídica foi acompanhada durante 40 min e foi realizada em duplicata. O efeito protetor (%Proteção) da antocianina foi calculado por meio da diferença de área sob a curva de decaimento da intensidade de fluorescência do C₁₁-BODIPY, em relação à oxidação nos lipossomas controle (sem antocianina), de acordo com a equação 1.

$$\%Proteção = \left(\frac{AUC_{C3G} - AUC_{LC}}{AUC_{LC}} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde AUC_{LC} e AUC_{C3G} são as áreas sob a curva na ausência (lipossomas controle-LC) e na presença de antocianina (C3G), respectivamente.

A concentração de antioxidante necessária para que se obtenha 50 % de proteção (EC_{50}), foi calculada, para cada condição de pH (3,1 e 7,4), utilizando os parâmetros obtidos com os ajustes lineares realizados para as curvas %Proteção vs concentração de cianidina 3-glucosídeo.

3. Resultados e Discussão

O estudo da oxidação lipídica em lipossomas foi realizado em dois sistemas com condições de pH diferentes, sendo um ácido e outro próximo a neutralidade, pois em soluções aquosas de antocianinas, o aumento do pH provoca um deslocamento do equilíbrio para a formação de bases quinonoidais (reação de desprotonação) e/ou hemiacetais (reação de hidratação) que segue para a formação de chalconas (reação de tautomerização), de acordo com a estrutura da antocianina (Figura 1). Não foi encontrado na literatura o valor da constante de desprotonação da cianidina 3-glucosídeo. No entanto, para o íon 3',4',7-triidroxi-3-metoxiflavílium os valores de pK_h e pK_a encontrados foram de 2,52 e 4,40 respectivamente (Dangles *et al.*, 1994). Considerando que $pK = -\log(K)$, pode ser estimar os valores de K_h e K_a em 3 e 0,04 mmol/L, respectivamente. Esses resultados indicam que em soluções aquosas desse íon flavílium, com o aumento do pH, a formação de hemiacetais é favorecida em relação à formação de bases quinonoidais (Mercadante & Bobbio, 2008). Devido à relativa semelhança entre a estrutura desse íon flavílium e a da cyd 3-glucosídeo, comportamento semelhante é esperado em soluções aquosas desta antocianina. Além disso, cabe salientar que derivados glicosilados não acilados de cianidina (cyd 3-xilosil-galactosídeo e cyd 3-glucosil-xilosil-galactosídeo) apresentaram valores de K_h (0,4 mmol/L) cerca de 10 vezes maior que os valores de K_a (0,04 mmol/L) (Redus *et al.*, 1999), indicando que para estes derivados de cianidina também é esperado que o aumento do pH provoque deslocamento do equilíbrio para a formação de hemiacetais em detrimento da formação de bases quinonoidais.

No presente estudo, o pH 3,1 foi escolhido por estar próximo ao valor da constante de equilíbrio de hidratação da cianidina 3-glucosídeo ($pK_h = 3,01$) (Stintzing *et al.*, 2002), ou seja, a condição de pH onde 50 % das moléculas de antocianinas presentes no meio estão na forma de cátion flavilium (coloração vermelha) e 50 % na forma de hemiacetais (incolor), Figuras 1. O pH 7,4 foi escolhido em função deste ser semelhante ao pH fisiológico, sendo que nesta condição, as formas de cianidina 3-glucosídeo presentes no meio são hemiacetais (B) e/ou chalconas (C), junto com uma parte das moléculas na forma de bases quinonoidais (A), Figuras 1. A Figura 2, que mostra os espectros UV-visível obtidos para cianidina 3-glucosídeo nas duas condições de pH empregadas neste estudo, indica a presença de diferentes formas da antocianina em solução. A cianidina 3-glucosídeo foi escolhida para a realização deste estudo por ser a antocianina mais amplamente distribuída na natureza.

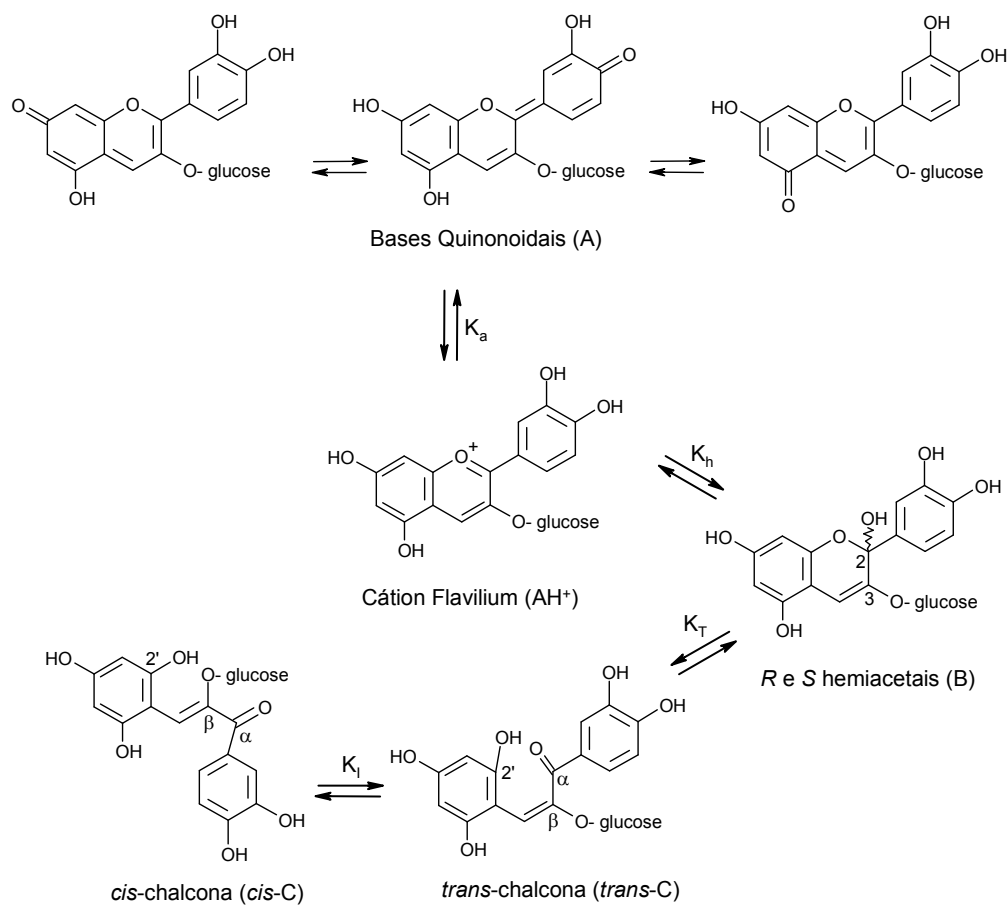


Figura 1. Transformações estruturais da cianidina 3-glucosídeo em solução aquosa. K_a – constante de equilíbrio de desprotonação, K_h – constante de equilíbrio de hidratação; K_T – constante de equilíbrio de tautomerização, K_I – constante de equilíbrio de isomerização.

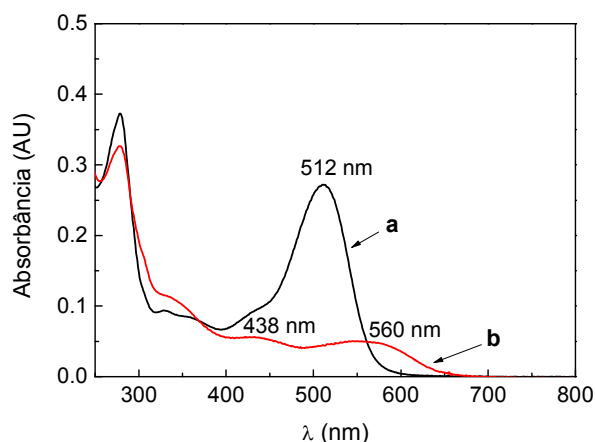


Figura 2. Espectros UV-visível da cianidina 3-glucosídeo (18,1 $\mu\text{mol/L}$) em (a) pH 3,1 (solução tampão citrato 12 mmol/L) e (b) pH 7,4 (solução tampão fosfato salino 12 mmol/L).

O C_{11} -BODIPY (Figura 3) é um análogo de ácido graxo que apresenta fluorescência na região do vermelho do espectro visível, com máximo de emissão a 595 nm. Conforme esse lipídio sofre oxidação por radicais livres, a intensidade de fluorescência vermelha inicial a 595 nm diminui, ocorrendo um deslocamento da banda de emissão para comprimentos de onda menores, com máximo em 520 nm, devido ao encurtamento do cromóforo (Drummen *et al.*, 2002).

Convém mencionar que, ao ser incorporado em lipossomas (SUV) preparados com iguais proporções de 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidilcolina e 1,2-dilinoleoil-fosfatidilcolina, o lipídio fluorescente C_{11} -BODIPY apresentou sensibilidade à oxidação, induzida por AAPH a 37 °C, da mesma ordem de magnitude da sensibilidade apresentada pelo ácido linoleico presente nos lipossomas (Drummen *et al.*, 2002).

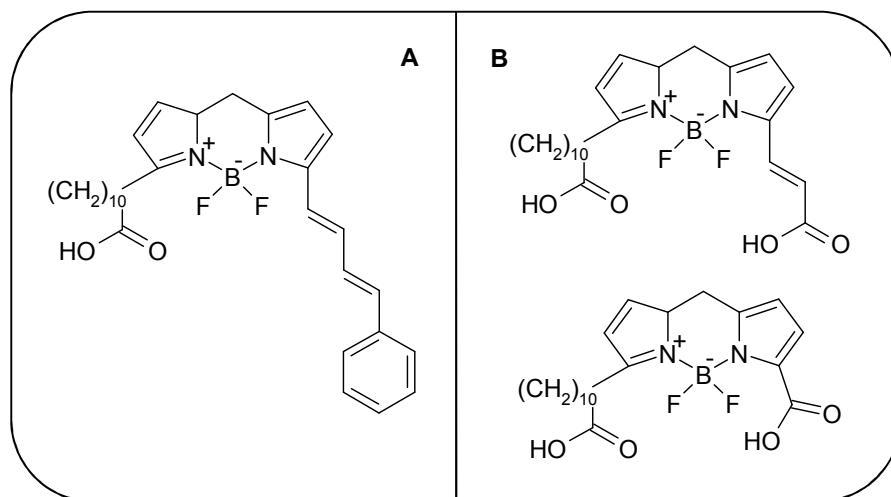


Figura 3. Estruturas do lipídio fluorescente C₁₁-BODIPY nas formas (A) não oxidada e (B) após oxidação induzida por radicais livres. Adaptado de Drummen *et al.* (2004).

Os espectros de emissão apresentados na Figura 4 mostram que em ambas condições de pH, na condição de excitação utilizada, a cianidina 3-glucosídeo não apresentou fluorescência, indicando que o C₁₁-BODIPY como indicador da oxidação lipídica pode ser utilizado em lipossomas na presença de antocianina.

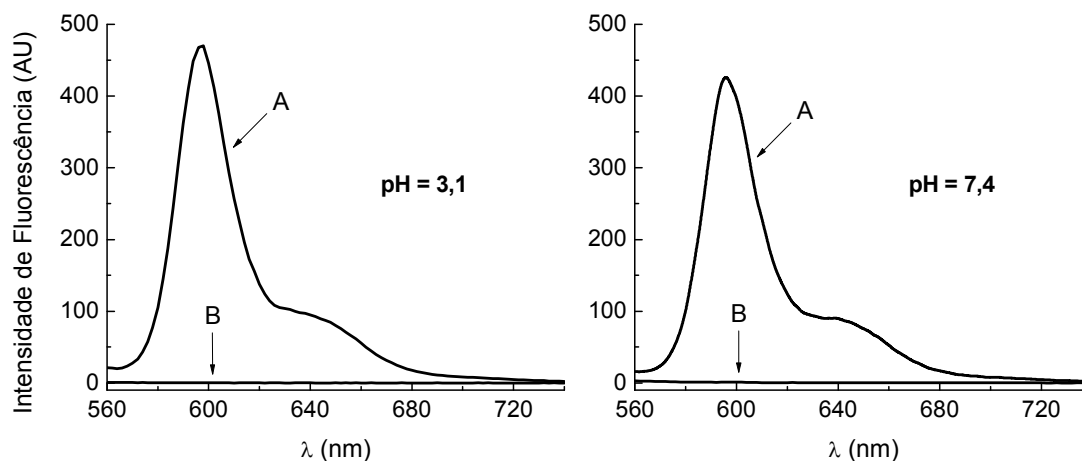


Figura 4. Espectros de emissão obtidos para lipossomas com C_{11} -BODIPY e sem cyd 3-glucosídeo (A) e lipossomas sem C_{11} -BODIPY com 50 $\mu\text{mol/L}$ de cyd 3-glucosídeo (B), em meios com pH 3,1 e pH 7,4. Condições: $\lambda_{\text{excitação}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 560\text{-}740 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{excitação}} = 2,5 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{emissão}} = 5 \text{ nm}$.

Os gráficos mostrados na Figura 5 apresentam o decaimento da intensidade de fluorescência do C_{11} -BODIPY ao longo do tempo nas duas condições de pH e diferentes concentrações de cianidina 3-glucosídeo incorporada nos lipossomas. Para obtenção dos dados na ausência de AAPH, a solução aquosa deste reagente foi substituída por igual volume de água deionizada.

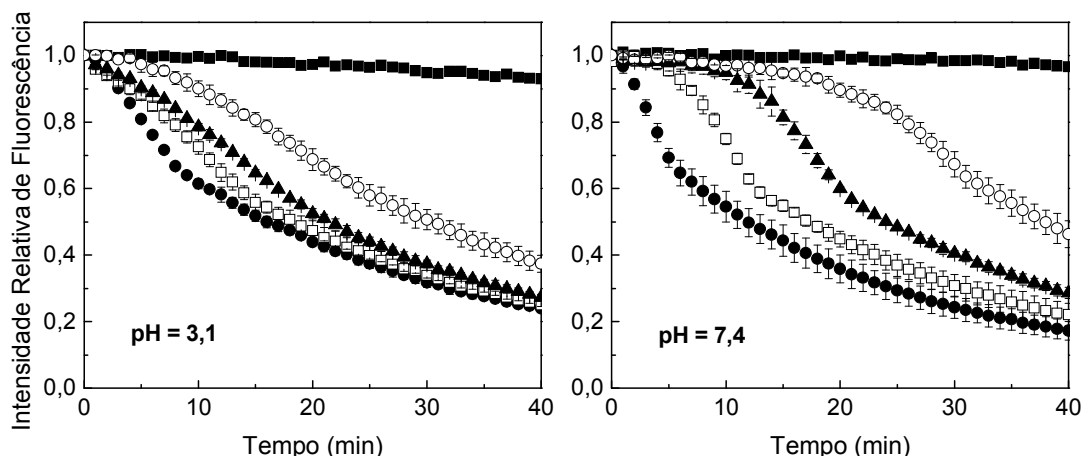


Figura 5. Variação da intensidade de fluorescência do C_{11} -BODIPY em lipossomas preparados em condições de pH 3,1 e pH 7,4, na ausência de AAPH (■) e na presença de 40 mmol/L de AAPH para LC (●), C3G-1 (□), C3G-2 (▲) e C3G-3 (○). Condições: $\lambda_{\text{excitação}} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 596 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{excitação}} = 2,5 \text{ nm}$; $\text{slit}_{\text{emissão}} = 5 \text{ nm}$.

Como mostrado na Figura 5, quando não se adiciona o iniciador de radicais livres, o lipídio fluorescente é estável nos lipossomas mantido a 37 °C em ambos os valores de pH. Estes resultados vêm de encontro ao estudo com C_{11} -BODIPY incorporado em lipossomas unilamelares preparados com fosfatidilcolina de ovo, em condições de pH entre 4 e 10, onde foi observado que a intensidade de fluorescência desse lipídio não sofreu alteração em função do pH do meio (Drummen *et al.*, 2002).

Como esperado, a presença de cianidina 3-glucosídeo nos lipossomas, em ambas as condições de pH, prolongou a fase de indução da oxidação lipídica (Figura 5), provavelmente, por meio da desativação de radicais livres (Rice-Evans *et al.*, 1996). Esse comportamento está de acordo com os resultados relatados por Zhang *et al.* (2006) na avaliação, por meio da oxidação lipídica induzida por AAPH em lipossomas contendo C_{11} -BODIPY, da atividade de diversos antioxidantes, entre os quais flavonoides não antociânicos e outros compostos fenólicos. A

diferença entre o efeito protetor em pH 3,1 e pH 7,4 conferido pelas formas de cianidina 3-glucosídeo em lipossomas pode ser melhor visualizada através da porcentagem de proteção em função da concentração de antocianina incorporada nos lipossomas (Figura 6).

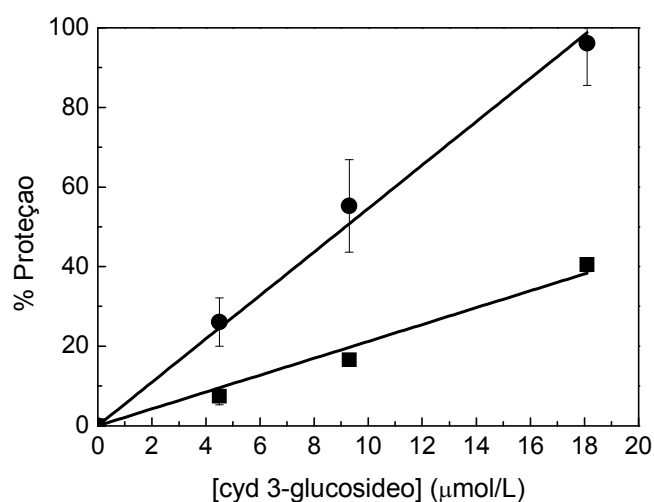


Figura 6. Efeito protetor da oxidação lipídica em lipossomas em função da concentração de cya 3-glucosídeo, em sistemas com pH 3,1 (■) e pH 7,4 (●), após 40 min de reação.

O valor de EC₅₀, que representa a concentração de antioxidante necessária para que se obtenha 50 % de proteção, foi calculado por meio de ajustes lineares dos dados da Figura 6. Nas condições estudadas, a cianidina 3-glucosídeo apresentou uma atividade antioxidante 2,6 vezes maior em pH 7,4, EC₅₀, de $9,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$, quando comparada com a atividade em pH 3,1 com EC₅₀ de $23,6 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$.

A maior atividade antioxidante em pH 7,4, onde estão presentes as formas hemiacetais e/ou chalconas e bases quinonoidais (B, C e A, respectivamente, Figura 1) da cianidina 3-glucosídeo, está relacionada com a redução no potencial de oxidação e aumento na capacidade de doar elétrons. Para cianidina 3-

glucosídeo o potencial de oxidação em solução tampão diminui conforme aumenta o pH do meio, o que indica que, em condições de pH mais alto, os compostos são mais facilmente oxidados e sua atividade antioxidante é maior (Lima *et al.*, 2007). Além disso, é esperado que as formas hemiacetais e chalconas apresentem maior capacidade de doar elétrons que o respectivo cátion flavilium, uma vez que os hemiacetais possuem uma hidroxila a mais na posição C2 e as chalconas apresentam uma carbonila nessa posição ($C\alpha$ na chalcona) e uma hidroxila em C2' (Figura 1). Segundo Vieyra *et al.* (2009), a capacidade redutora diminui na seguinte ordem 3,7-diidroxiflavona (DHF) > 2',4'-diidroxichalcona (DHC) > 7-hidroxiflavanona (HF), em função da presença de uma hidroxila adicional no carbono 3 (C3) e de uma ligação dupla em C2-C3 na DHF, bem como da presença de ligação dupla em $C\alpha$ - $C\beta$ na DHC (equivalente a posição C2-C3 na DHF).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com aqueles relatados por Vieyra *et al.* (2009), onde a capacidade de desativação de radicais livres (ABTS^{•+} e DPPH[•]) e de oxigênio singlete (1O_2) foi maior para os flavonoides com maior capacidade de doar elétrons, e as constantes de desativação total de 1O_2 aumentaram com o aumento do pH devido a presença de formas desprotonadas dos flavonoides. Além disso, a presença de ligações duplas em conjugação com um grupo cetônico, que ocorre tanto nas chalconas como nas bases quinonoidais, é um elemento estrutural essencial para uma eficiente atividade antioxidante (Bors *et al.*, 1990), contribuindo para explicar o maior efeito protetor apresentado pela cianidina 3-glucosídeo em meio neutro.

Segundo Rice-Evans *et al.* (1996), uma das condições a serem satisfeitas para um composto fenólico ser definido como antioxidante é que esse composto seja capaz de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato, estando presente em uma concentração baixa em relação ao substrato a ser oxidado. Sendo assim, pode-se afirmar que as formas de cianidina 3-glucosídeo presentes no meio, em ambas as condições de pH, cumprem essa condição, uma vez que os valores de EC_{50} representam razões molares de 0,0081 e 0,0032 de antocianina em pH 3,1 e

pH 7,4, respectivamente, em relação aos lipídios presentes no meio (fosfatidilcolina e C₁₁-BODIPY). Além disso, em ambos meios com diferentes valores de pH, a inibição da oxidação lipídica foi dose-dependente, sendo diretamente proporcional à concentração de cianidina 3-glucosídeo, nas condições estudadas.

As porcentagens de proteção obtidas com 10 $\mu\text{mol/L}$ (5,03 $\mu\text{g/mL}$) de cyd 3-glucosídeo foram calculadas, por meio dos ajustes lineares da Figura 6, onde se obtiveram valores de 21 e 55 % nas condições de pH 3,1 e 7,4, respectivamente. Esses resultados estão na mesma faixa daqueles encontrados para antocianinas isoladas de frutas, contendo misturas de glicosídeos de delphinidina, cianidina e petunidina. Essas antocianinas, a uma concentração de 8,4 $\mu\text{g/mL}$, inibiram entre 27 e 54 % a formação de dienos conjugados, quando incorporadas em lipossomas (SUV) contendo lactalbumina, preparados por meio de ultrassom com solução tampão pH 6,6, submetidos à oxidação induzida por cobre a 37 °C por 6 dias (Viljanen *et al.*, 2004b). Além disso, o resultado obtido em pH 7,4 (55 % de proteção para 10 $\mu\text{mol/L}$ de antocianina) está próximo à faixa de porcentagem de inibição de formação de dienos conjugados (65-80 %) obtidas em outro trabalho do mesmo grupo, utilizando o mesmo tipo de sistema (SUV, com lactalbumina, em pH 6,6), onde foi incorporado 10 $\mu\text{mol/L}$ de cianidina 3-glucosídeo ou da respectiva aglicona, sendo a oxidação induzida por cobre a 37 °C por 6 dias (Viljanen *et al.*, 2004a).

De acordo com resultados obtidos a partir dos ajustes lineares da Figura 6, 50 $\mu\text{mol/L}$ de cyd 3-glucosídeo pode alcançar 100 % de proteção, tanto em pH 3,1 como em pH 7,4. As possibilidades de efeito pró-oxidante ou perda da atividade da antocianina, neste caso, podem ser descartadas, pois foi realizado um teste com 50 $\mu\text{mol/L}$ de cyd 3-glucosídeo incorporada nos lipossomas em pH 3,1 e 7,4, onde foi observado que a antocianina continuava apresentando efeito protetor (dados não mostrados). Esses resultados indicam uma atividade antioxidante, principalmente em pH neutro, bastante superior àquela relatada em outros trabalhos. Em lipossomas (SUV), por exemplo, previamente preparados por meio

de ultrassom, com solução tampão pH 7,4, a adição de 50 $\mu\text{mol/L}$ de cianidina ou cianidina 3-glucosídeo reduziu em 30 e 34 %, respectivamente, a formação de malondialdeído (determinado por HPLC) após 6 h de oxidação induzida por AAPH a 37 °C (Tsuda *et al.*, 1994). A mesma concentração de cianidina (50 $\mu\text{mol/L}$) adicionada ao mesmo tipo de lipossomas (SUV, obtido por ultrassom, pH 7,4), submetidos a oxidação induzida por cobre a 37 °C por 2 h, inibiu em 85 % a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Hassimotto *et al.*, 2005). Por outro lado, essa mesma aglicona (cianidina) apresentou efeito pró-oxidante quando adicionada a lipossomas (obtido por ultrassom, em solução aquosa não tamponada com pH inicial 4,6), submetidos a oxidação induzida por cobre a 37 °C durante 1 a 3 dias (Satué-Gracia *et al.*, 1997).

No entanto, diferenças nos resultados de atividade antioxidante são esperadas quando se compara os dados obtidos neste trabalho com aqueles relatados na literatura. Isso porque, em todos os trabalhos citados acima, a porcentagem de proteção conferida pelos compostos antioxidantes foi avaliada nas fases entre propagação e terminação, sendo que, em alguns casos, o acompanhamento do processo oxidativo baseou-se em compostos secundários da oxidação, enquanto que no presente trabalho a oxidação foi acompanhada na fase inicial alcançando no máximo a fase de propagação.

Além disso, o fato dos compostos serem incorporados nos lipossomas durante o preparo dos mesmos (como foi feito neste trabalho e naqueles reportados por Viljanen *et al.* (2004a, b)) ou serem misturados aos lipossomas previamente preparados (como foi feito nos trabalhos relatados por Tsuda *et al.* (1994) e Hassimotto *et al.* (2005)) também pode proporcionar diferentes resultados de atividade antioxidante, embora essa diferença de atividade seja menor quando os antioxidantes em estudo são compostos hidrofílicos, como demonstrado por Zhang *et al.* (2006).

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que todas as formas de cianidina 3-glucosídeo em equilíbrio nas condições de pH estudadas foram capazes de prolongar o período de indução da oxidação lipídica iniciada por radicais livres, em sistema mimetizador de membranas. A mistura de hemiacetais e/ou chalconas, junto com bases quinonoidais, que estão presentes em meio neutro, apresentaram atividade 2,6 vezes maior que a mistura de cátion flavílium e hemiacetais, presentes em pH 3,1.

Agradecimentos: Os autores agradecem a FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro.

5. Referências Bibliográficas

- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355, 1990.
- Brouillard, R. *Chemical Structure of Anthocyanins*. In: Anthocyanins as Food Colors. Markakis, P. (Ed.). Academic Press Inc., New York, p.1-39, 1982.
- Cantrell, A.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G.; Rancan, F.; Böhm, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 47-54, 2003.
- Cooke, D.; Steward, W.P.; Gescher, A.J.; Marczylo, T. Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41, 1931-1940, 2005.

- Dangles, O.; Elhabiri, M.; Brouillard, R. Kinetic and thermodynamic investigation of the aluminium-anthocyanin complexation in aqueous solution. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 2*, 2587-2596, 1994.
- De Rosso, V.V.; Vieyra, F.E.M.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radical Research*, 42, 885-891, 2008.
- Drummen, G.P.C.; Gadella, B.M.; Post, J.A.; Brouwers, J.F. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY^{581/591}. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1635-1644, 2004.
- Drummen, G.P.C.; van Liebergen, L.C.M.; Op den Kamp, J.A.F.; Post, J.A. C11-BODIPY^{581/591}, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 473-490, 2002.
- Faria, A.; Oliveira, J.; Neves, P.; Gameiro, P.; Santos-Buelga, C.; Freitas, V.; Mateus, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6896-6902, 2005.
- Francis, J. F. *Analysis of anthocyanins*. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P. (Ed.). Academic Press, New York, p. 181-207, 1982.
- Graversen, H.B.; Becker, E.M.; Skibsted, L.H.; Andersen, M.L. Antioxidant synergism between fruit juice and α -tocopherol - a comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*). *European Food Research and Technology*, 226, 737-743, 2008.
- Hassimotto, N.M.A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935, 2005.

-
- Heinonen, I.M.; Meyer, A.S.; Frankel, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107-4112, 1998.
- Heredia, F.J.; Franchia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Vicario, I.M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I: pH effect. *Food Chemistry*, 63, 491-498, 1998.
- Houbiers, C.; Lima, J.C.; Maçanita, A.L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of flavylum cation e copigmentation with the z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 3578-3585, 1998.
- Lasic, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 307-321, 1998.
- Lima, A.A.; Sussuchi, E.M.; Giovani, W.F. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. *Croatica Chemica Acta*, 80, 29-34, 2007.
- Lila, M.A. Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313, 2004.
- Mercadante, A.Z.; Bobbio, F.O. *Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties*. In: Food colorants – chemical and functional properties. Socaciu, C. (Ed.). CRC, New York, p.241-276, 2008.
- Redus, M.; Baker, D.C.; Dougall, D.K. Rate and equilibrium constants for the dehydration and deprotonation reactions of some monoacylated and glycosylated cyanidin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3449-3454, 1999.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, 1996.

- Roberts, W.G.; Gordon, M.H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1486-1493, 2003.
- Satué-Gracia, M.T.; Heinonen, M.; Frankel, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3362-3367, 1997.
- Seeram, N.P. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 630-635, 2008.
- Stintzing, F.C.; Stintzing, A.S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172-6181, 2002.
- Strack, D.; Wray, V. *The Anthocyanins*. In: *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall/CRC, New York, p.1-22, 1994.
- Taylor, T.M.; Davidson, P.M.; Bruce, B.D.; Weiss, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587-605, 2005.
- Tsuda, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Norinobu, S.; Choi, S.-W.; Kawakishi, S.; Osawa, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyaniding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2407-2410, 1994.
- Vieyra, F.E.M.; Boggetti, H.J.; Zampini, I.C.; Ordoñez, R.M.; Isla, M.I.; Alvarez, R.M.S.; De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z.; Borsarelli, C.D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radical Research*, 43, 553-564, 2009.

-
- Viljanen, K.; Kivikari, R.; Heinonen, M. Protein–lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1104-1111, 2004a.
- Viljanen, K.; Kylli, P.; Kivikari, R.; Heinonen, M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7419-7424, 2004b.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309, 1997.
- Yamasaki, H.; Uefuji, H.; Sakihama, Y. Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332, 183-186, 1996.
- Youdim, A.K.; Martin, A.; Joseph, J.A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 51-60, 2000.
- Zhang, J.; Stanley, R.A.; Melton, L.D. Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membranes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 714-724, 2006.

CAPÍTULO VI

CHARACTERIZATION AND SINGLET OXYGEN QUENCHING ABILITY OF GUM ARABIC AND MALTODEXTRIN SPRAY- DRIED MICROCAPSULES CONTAINING ANTIOXIDANT MOLECULES

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista

Langmuir

ABSTRACT

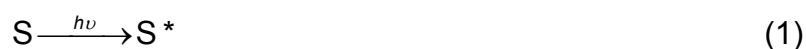
Microcapsules prepared with gum arabic (GA) or maltodextrin 20DE (MD) containing antioxidant (AOx) molecules, such as carotenoids and tocopherol derivatives, were prepared by the spray-drying technique. The properties of these microcapsules were evaluated by several techniques, such as dynamic light scattering (DLS), scanning electronic microscopy (SEM), and steady-state and dynamic fluorescence spectroscopy. The results showed that the GA wall forms less polar, and more rigid and compacted hydrophobic domains than those in the MD microcapsules, improving the solubilization of apolar molecules and reducing the accessibility of oxygen molecules. The microencapsulation efficiency (ME) varied between 80-99 % and 64-93 % for GA and MD microcapsules, respectively. The mean diameters of the microcapsules were slightly larger for GA (8.2-9.9 μm), as compared to MD (5.9-8.2 μm) preparations. The quenching of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by these microcapsules was evaluated in D_2O solutions using time-resolved phosphorescence detection (TRPD). The results indicated that the quenching rate constant of $^1\text{O}_2$ by AOx, e.g. $k_{\text{Q}}^{\text{AOx}}$, is reduced almost two-orders of magnitude in both GA and MD microcapsule solutions as compared with homogenous media. These results are explained by the compartmentalization effects of AOx molecules in the microcapsules, which results in lower accessibility of $^1\text{O}_2$ and reduced quenching efficiency. This effect decreases as the polarity of AOx molecules increases, being tocopherol derivatives less influenced by encapsulation than carotenoids.

KEYWORDS: microencapsulation, carotenoids, tocopherol, singlet oxygen, antioxidant activity.

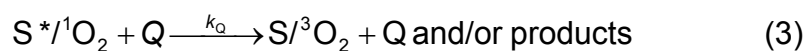
Introduction

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is the lowest excited state of the ground triplet state of dioxygen ($^3\text{O}_2$), with 94 kJ/mol of excitation energy and several microseconds of lifetime.^{1,2} Because of these properties and its ubiquity in chemical and biological media, this nonradical species efficiently reacts with most electron-rich ground state singlet state molecules to form primary oxidation products, e.g. hydroperoxides, dioxetanes, epoxides, endoperoxides, etc.³ The reactivity of $^1\text{O}_2$ in food induces the formation of off-flavor and nutritional losses,⁴ and therefore, the development of new technologies and approaches that prevent these undesired effects is a current goal.⁵

The generation of $^1\text{O}_2$ in solution can be achieved in several ways, e.g. chemically, enzymatically and photochemically.¹⁻⁵ In the last case, many food components can act as sensitizer (S), absorbing UVA and/or visible light to form singlet and/or triplet excited states (S^*) which, *via* energy-transfer to $^3\text{O}_2$, generate the ground state of the sensitizer and $^1\text{O}_2$ (eqns. 1 and 2).



In this type of mechanism, $^1\text{O}_2$ can be avoided by trivial blocking of the excitation light ($h\nu$), with either internal or external filters, and/or by efficient deactivation of the excited states of S^* and/or $^1\text{O}_2$ by quencher molecules (Q) through direct chemical and/or physical interaction (eqn. 3).



The k_{Q} ($= k_{\text{c}} + k_{\text{p}}$) value is the bimolecular rate constant for the total quenching (chemical + physical). The chemical quenching represents the sacrificial reaction of the quencher with the excited state leading to the formation of chemical products. On the contrary, in physical quenching, the deactivation of the excited states occurs by a variety of dissipative mechanisms that regenerate the reaction partners

in their electronic ground state, now available for another round of excited state deactivation directed to S^* or 1O_2 . Typically, in air-saturated solutions, the sensitizer excited states S^* are efficiently quenched by 3O_2 ,⁶ favoring the formation of 1O_2 (eqn. 2). Therefore, quencher molecules interact more efficiently with 1O_2 , preventing the oxidative action of 1O_2 in biological or food molecular targets (antioxidant action).⁷ This is the case of natural antioxidants (AOx), such as carotenoids and vitamin E (tocopherol) derivatives (for illustrative structures, see Figure 1), which are very efficient 1O_2 ⁸⁻¹³ quenchers.

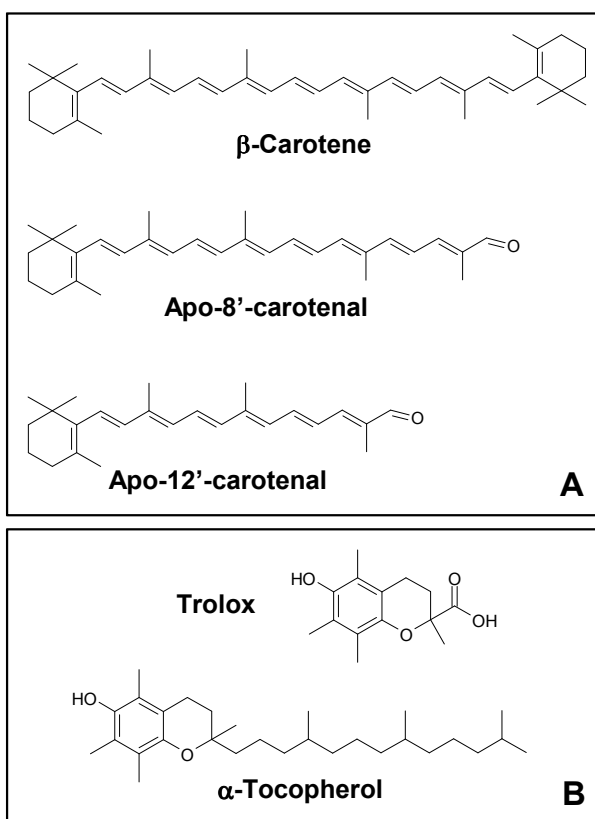


Figure 1. Structures of carotenoids (A) and tocopherol derivatives (B) used in this study.

In the case of foods, this antioxidant action contributes to a superior product stability⁵ and, therefore, to a better consumer acceptance.¹⁴ However, most of these AOx molecules are poorly soluble in aqueous media and, as it is the case of

carotenoids, they are also quite susceptible to degradation under high temperature, low pH and in the presence of light and oxygen, among other factors commonly found during food processing.¹⁵

In order to overcome these issues, spray-drying microencapsulation has been claimed to be a suitable and affordable methodology for preserving and carrying labile food ingredients, such as flavors, lipids, and carotenoids.^{16,17} In this process, a liquid solution of food ingredient and a biopolymer are atomized in a hot gas current to instantaneously obtain a powder. This material consists of tiny core particles or droplets of the active material surrounded by a coating matrix made by the biopolymer (wall material).¹⁷

Most studies on spray-dried microencapsulation concern the encapsulation efficiency and stability of the core material.¹⁸⁻²² However, to the best of our knowledge, very few studies have been done up to the present day in order to address the antioxidant properties of these materials.⁵

Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of the spray-dried encapsulation process on the $^1\text{O}_2$ quenching capacity of some carotenoids and tocopherol derivatives (Figure 1). In addition, the composition and some structural properties of gum arabic and maltodextrin microcapsules were determined.

Materials and Methods

Materials. Vitamin E (DL α -tocopherol, TP), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid, TX), β -carotene (BC), Rose Bengal (RB) as a sodium salt, and pyrene (Py) were obtained from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Apo-8'-carotenal (A8) and apo-12'-carotenal (A12) were donated by DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). These compounds were used as received, with exception of BC, which was recrystallized up to 98 % purity, as monitored by HPLC-DAD. Powdered gum arabic (GA, MW = 3.5×10^5 g/mol) was supplied by Colloids Naturels Brasil (São Paulo, Brazil), and maltodextrin 20DE

(MD, MW = 1000 g/mol) was supplied by Corn Products Brasil (Mogi Guaçu, Brazil). Analytical grade organic solvents were obtained from Sintorgan (Buenos Aires, Argentina) and deuterium oxide (99.9 % purity) from Sigma-Aldrich. Aqueous solutions were prepared with Milli-Q quality water.

Preparation of microcapsules. The different microcapsules were prepared using a laboratory-scale spray-drier system Lab Plant SD-04 (Huddersfield, U.K.), under the following working conditions: aspersion nozzle diameter of 0.7 mm, air pressure of 5 kgf/cm², air flow rate of 30 mL/min, entrance and exit air temperatures of 170 and 110 °C, respectively. Solutions of each biopolymer (200 mL of solution at 30 % (w/v) of soluble solid) were prepared in distilled water at 45 °C and kept under continuous stirring until temperature reached 30 °C. Each core material was dissolved in a suitable solvent (dichloromethane for carotenoids and Py and ethanol for TX and TP) and added to the polysaccharide solution. Vigorous mechanical stirring (7000 rpm) was maintained for 30 min in order to obtain an emulsion. Afterward, Milli-Q quality water was added to obtain 300 mL of a 20 % (w/v) biopolymer solution. The emulsion was placed in the spray-drier chamber, slow agitation was applied during the spray-drying process. The microcapsules obtained were immediately stored in a glass bottle under N₂ atmosphere at freezer temperature (−36 °C) to avoid AOx degradation.

Microencapsulation efficiency (ME). For the microcapsules containing carotenoids, this parameter was determined according to Nunes & Mercadante.²³ Briefly, for the exhaustive extraction of total carotenoid with dichloromethane, the MD and GA microcapsules were previously dissolved in water or water:methanol (2:3), respectively. The carotenoids located on the surface of the microcapsules were directly extracted with dichloromethane from the powdered microcapsules. In both analysis, the organic phases were recovered in a separation funnel and dried with anhydrous Na₂SO₄. Afterwards, the organic solvent was removed under vacuum in a rotary evaporator (T < 35 °C), and the carotenoids were re-dissolved in petroleum ether for quantification by UV-visible absorption spectroscopy, using an Agilent 8453 diode-array spectrophotometer (Santa Clara, USA). Carotenoid

concentrations were calculated according to their absorptivity values ($E_{1cm}^{1\%}$) at maximum wavelength, as reported by Davies.²⁴

For TX and TP microcapsules, the total antioxidant content was determined in aqueous solutions by measuring TX or TP absorbance at 290 nm, using a solution of empty microcapsules at the same concentration as blank. The antioxidant content on the surface of the microcapsule was determined by extraction with ethanol and the supernatant separated by centrifugation (4000 rpm). The supernatant was dried with anhydrous Na_2SO_4 during 30 min and filtered, and the solvent was removed under vacuum at 35 °C afterwards. The extracted TX or TP was re-dissolved in a small volume of ethanol and quantified by UV-visible at the maximum wavelength (290 nm). In both cases, TX and TP calibration curves, with at least five standard concentrations between 60 and 300 $\mu\text{mol/L}$, were performed in water and ethanol solutions.

The total Py concentration in the microcapsules was estimated by the measurement of the Py absorbance of the microcapsule's aqueous solutions at 336 nm ($\epsilon = 5.6 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)²⁵ and corrected for background absorbance and/or scattering with a solution with the same concentration of "empty" microcapsules.

Microcapsule properties. Particle size distribution of the microcapsules was obtained by dynamic light scattering (DLS) measurement using a Malvern-Mastersizer S-MAM-5005 (Worcestershire, UK). The microcapsules (5 mg/mL) were suspended in isopropyl alcohol, since the microcapsules are not soluble in this solvent. The data was collected as a series of five measurements of duplicate microcapsule suspensions.

The morphology of the microcapsules was evaluated by scanning electronic microscopy (SEM) with a JEOL JSM 5800 LV apparatus (Tokyo, Japan), using acceleration voltage of 10 kV. The microcapsules were fixed in stubs containing a double-faced adhesive metallic tape and coated with gold in a Balzers evaporator (SCD 050, Lichtenstein) during 75 s with a 40 mA current.

The microenvironmental properties of the core region of microcapsules were analyzed by the fluorescence of Py using a Hitachi F-2500 spectrofluorometer (Kyoto, Japan). The solutions were previously bubbled with air during 15 min to minimize the quenching effect by molecular oxygen. Excitation and emission spectra were registered with bandwidth slits of 2.5 nm. The fluorescence intensity ratios between the vibronic bands I (371 nm) and III (383 nm), e.g. I_I/I_{III} ,²⁶ and between excimer (460 nm) and monomer (371 nm) of Py molecules, e.g. I_E/I_M ,²⁷ were monitored by excitation at 326 nm.

Steady-state fluorescence anisotropy (r) measurements were performed with the Hitachi F-2500 fluorometer equipped with excitation and emission polarizer sheets (Melles-Griot 03FPG003, Rochester, NY, USA). The r value was calculated using the classical equation 4, where I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} and I_{HH} are the fluorescence intensity at different vertical and horizontal positions of both excitation and emission polarizers, respectively, and G is the monochromator grating correction factor, which was determined for each solution in order to minimize scattering effects.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{with} \quad G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (4)$$

Oxygen permeability through the wall of microcapsules was evaluated by the Py fluorescence quenching by oxygen, either by stationary or time-resolved experiments. In the last case, a Nd:YAG laser (Minilite II, Continuum, Santa Clara, CA, USA), operating at 355 nm, was used as excitation source, and the Py fluorescence decays were collected perpendicularly to the excitation beam at 375 nm with the PTI-101 monochromator (Birmingham, NJ, USA) coupled with a photomultiplier Hamamatsu R928 (Hamamatsu, Japan). The output signals were collected and averaged with a digital oscilloscope operating at 2.5 Gsample/s (Tektronix TDS3032B, Forest Grove, OR, USA). The decays were analyzed as monoexponential decays by deconvolution, using the OriginLab 8.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Quenching of singlet oxygen. Photosensitized generation and transient phosphorescence detection of $^1\text{O}_2$ were performed as previously described.^{5,13,28} Briefly, Rose Bengal (8 $\mu\text{mol/L}$) was excited with laser pulses at 532 nm (10 ns FWHM, 3 mJ/pulse) in air-saturated acetonitrile or D_2O solutions. The transient phosphorescence signal of $^1\text{O}_2$ was monitored at 1270 nm as a function of the quencher concentration. All the experiments were performed at 25 ± 1 °C in duplicates, and the average and standard deviation values of the k_{Q} values were reported.

Results and Discussion

Microcapsule properties. Table 1 summarizes the core concentration and microencapsulation efficiency (ME) of GA and MD microcapsules prepared in this study. As a general trend, the microcapsules prepared with GA showed better ME values of all polar and apolar AOx molecules as compared to MD microcapsules. In particular, β -carotene and apo-carotenals were almost fully incorporated into GA microcapsules, but in MD microcapsules the ME followed the trend $\text{A12} > \text{A8} > \text{BC}$, indicating a larger affinity of MD for more polar and low molecular weight carotenoids. On the other hand, for TP and TX, no significant differences were observed on the ME values in both types of microcapsules, indicating that only the chromanol ring governs the interaction with the wall material.

Table 1. Microcapsule composition, core molecule concentration, microencapsulation efficiency (ME) and mean diameter of the spray-dried microcapsules prepared with gum arabic (GA) and maltodextrin 20DE (MD).

Wall material	Core molecule	Abbreviation	[Core] ^{a,b}	ME ^b (%)	Main diameters ^{b,c} (μm)	
					<i>d</i> ₁	<i>d</i> ₂
Gum Arabic	None	GA	-	-	0.79	10.76
	Trolox	TX-GA	2.60	80.7	0.59	10.28
	Tocopherol	TP-GA	1.55	80.0	0.60	11.49
	β-carotene	BC-GA	1.39	99.0	0.71	11.95
	Apo-8'-carotenal	A8-GA	0.37	96.6	0.74	10.68
	Apo-12'-carotenal	A12-GA	0.53	94.9	0.76	10.12
	Pyrene	Py-GA	0.26	n.d. ^d	0.66	10.58
Maltodextrin 20DE	None	MD	-	-	0.93	9.13
	Trolox	TX-MD	1.88	75.0	0.60	10.08
	Tocopherol	TP-MD	2.13	73.0	0.89	9.28
	β-carotene	BC-MD	1.04	63.9	0.91	8.42
	Apo-8'-carotenal	A8-MD	0.35	75.7	0.89	7.70
	Apo-12'-carotenal	A12-MD	0.55	92.8	0.91	8.86
	Pyrene	Py-MD	0.02	n.d.	n.d.	n.d.

^a μmol core molecule/g wall material

^b Relative standard deviation values (RSD) ranged between 0.1 and 7.5 %

^c Determined by DLS, and represents the particle diameter of the two main population of microcapsules.

^d n.d.: not determined

Figure 2 shows typical SEM micrographs and DLS size distribution plots of GA and MD microcapsules containing the apo-12'-carotenal. The microcapsules prepared with GA showed more irregular surface than those with MD. The formation of dented surfaces on spray-dried microcapsules was attributed to the shrinkage of the particles during the drying process.²⁹ This shrinkage is influenced by the composition of the polysaccharide used as wall material; being the surface

more smoothed the greater the amount of low molecular weight residues on it, which may act as a plasticizer, preventing shrinkage of the surface during drying.¹⁹ Interestingly, the surface morphology was independent of the AOx molecule included, pointing out that the surface characteristics of the microcapsule is mainly governed by the wall material and probably by the microencapsulation technique, as it was already observed for spray-dried lycopene-GA,⁵ β -carotene-MD,¹⁹ bixin-GA or -MD.²¹ Thus, the dented morphology of GA microcapsules probably contributes to increase the effective surface and the hydrophobic domains. As depicted in Figure 2, for both microcapsule systems, polydispersion of particle size was observed. Despite this fact, the mean diameter was independent on the AOx core, and the microcapsule diameter was slightly larger for GA, as compared to MD preparations (Table 1).

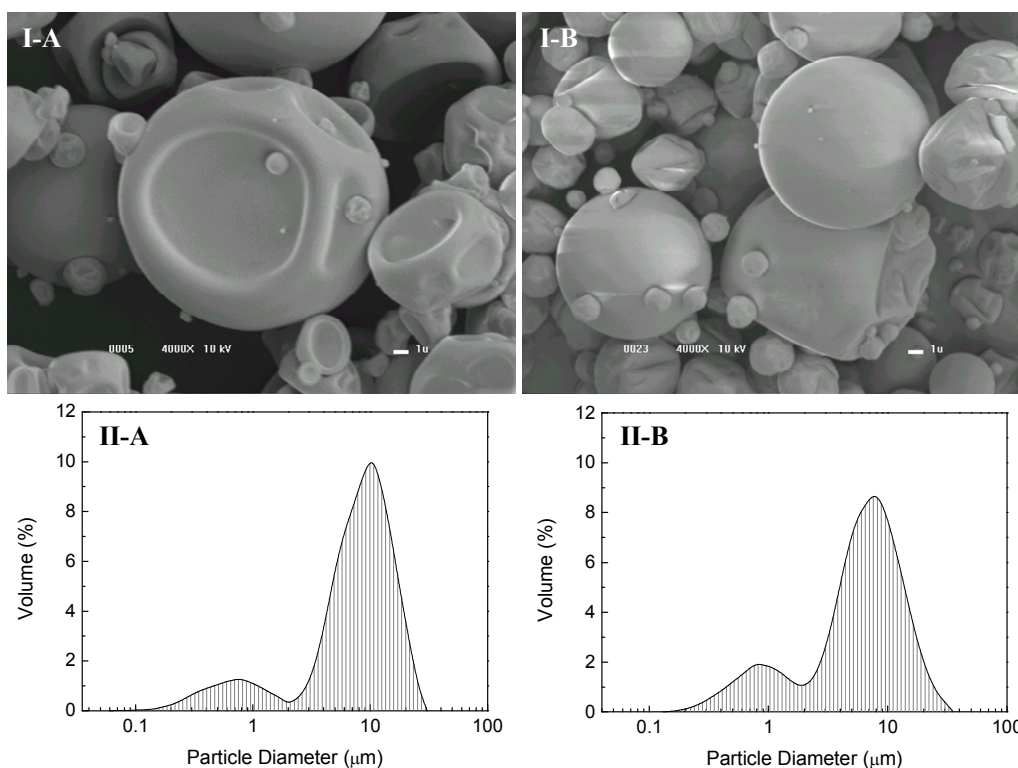


Figure 2. (I) SEM micrographs (magnified 4000 \times ; acceleration voltage of 10 kV) and (II) particle size distribution (by DLS measurements) obtained from microcapsules containing apo-12'-carotenal (A12) prepared with: (A) gum arabic (GA) and (B) maltodextrin 20DE (MD) as wall material.

These differences can be associated with the structure and composition of the biopolymers used as wall material. Structurally, GA is a complex and variable mixture of arabinogalactan oligosaccharides, polysaccharides and glycoproteins with molecular weight around 300 kDa.^{30,31} On the other hand, MD, as a product of starch hydrolysis, is a mixture of short polymers of D-glucose (3-20 units), in which the individual α -D-glucopyranosyl residues are joined by (1 \rightarrow 4) linkages to give linear chains with a certain degree of chain branching due to (1 \rightarrow 6) bonds.³²

Therefore, it can be expected a larger number and diversity of hydrophobic domains in GA than in MD microcapsules, improving the localization of non-polar molecules. This effect was particularly noticed for the aromatic molecule pyrene (Py), whose core concentration in GA microcapsules was one-order of magnitude larger than that for MD preparations, Table 1.

The Py fluorescence is very sensitive to microenvironmental solvent properties and self-concentration effects, and it is an useful tool for the characterization of both conformational and/or microenvironmental properties in supra- and macromolecular systems.^{26,27} Figure 3 shows the excitation and emission spectra of Py under different conditions. In dilute Py aqueous solutions, only the typical monomer emission between 360-450 nm was observed (spectrum **a**). However, in both microcapsule solutions, the characteristic red-shifted broad band, due to the emission of the Py excimer (Py \cdot Py)*, was also detected (spectra **b** and **c**). The formation of this excimer requires the pairing of two Py molecules in a sandwich configuration, where the exciton is delocalized by resonance between both molecules.²⁷ Two mechanisms of excimer formation are normally operating, *i.e.* in the “dynamic excimer”, a ground state molecule interacts with an electronically excited state during its lifetime.³³ However, under no diffusion controlled conditions, such as in rigid covalently bonded dimers, or in microheterogeneous media with nano-sized hydrophobic pockets, where high local concentration is reached, the excimer-like emission can involve the excitation of pre-associated ground state dimers, also called “static excimers”.²⁷

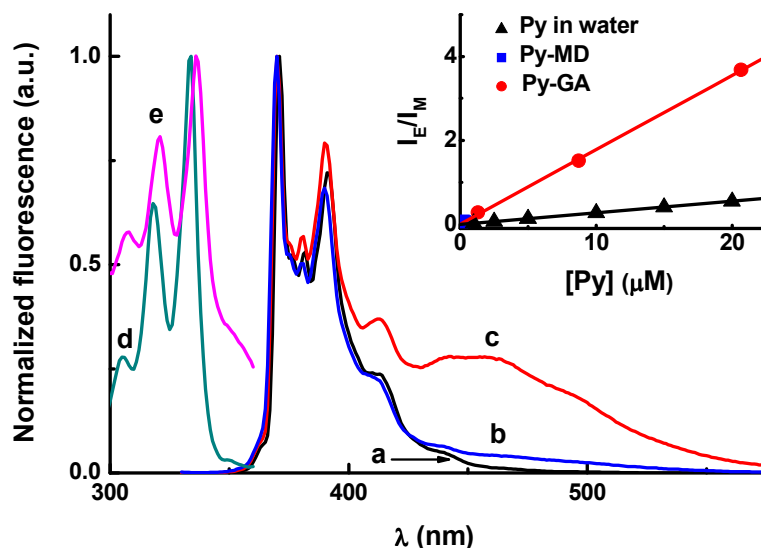


Figure 3. Pyrene emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 326 \text{ nm}$) of $0.7 \text{ } \mu\text{mol/L}$ Py (a), $0.3 \text{ } \mu\text{mol/L}$ Py-MD (b), and $1.3 \text{ } \mu\text{mol/L}$ Py-GA (c), all in water. Pyrene excitation spectra of $1.3 \text{ } \mu\text{mol/L}$ Py-GA obtained at emission wavelength of 370 nm (d) and 480 nm (e). **Inset:** Variation of the excimer (460 nm) to monomer (375 nm) intensity ratio, I_E/I_M , as a function of the pyrene concentration.

In the microcapsule suspensions, the static excimer mechanism of Py can be assured accordingly to the following facts: i) the absorption spectrum of Py in microcapsule solutions was broader and with less vibronic resolution than that in homogenous solvents (data not shown); ii) the excitation spectra of Py in GA-microcapsules monitored at the excimer emission (spectrum e) showed more spectral broadening, red-shifting, and decreased peak-to-valley intensity ratio as compared with that obtained at the monomer emission (spectrum d); and iii) the variation of the excimer-to-monomer intensity ratio I_E/I_M , as a function of the Py concentration, was almost six-times higher in the microcapsule than in water solutions, inset of Figure 3. Thus, the existence of ground state Py dimers in the microencapsulated solutions can be associated with the presence of the

hydrophobic micro-domains in the structure of the microcapsule, which increases the local concentration of Py.

In addition, the fluorescence intensity ratio of the vibronic monomer bands I and III of Py, *e.g.* I_I/I_{III} , indicates the polarity properties of the microenvironment.²⁶ In the case of GA-microcapsules, the initial $I_I/I_{III} = 1.74$ was comparable to that observed in acetonitrile ($\epsilon_r = 37.5$), while, in MD-microcapsules, the ratio was higher and close to that reported for dimethyl sulphoxide ($I_I/I_{III} = 1.95$, $\epsilon_r = 46.7$),²⁶ indicating that Py molecules are located in less polar micro-domains in GA than in MD microcapsules. Noteworthy, for both microcapsule systems the I_I/I_{III} ratio was almost constant during the first 50 h of dispersion in water, indicating that no relevant structural changes in the microcapsules are produced during the first hours of dispersion in water.

Finally, the permeability of molecular oxygen into the microcapsules was evaluated by its efficiency of quenching the Py fluorescence. The fluorescence spectrum of Py was monitored in argon, air, and oxygen saturated aqueous solutions, as shown in Figure 4, for Py-GA solutions. In GA microcapsules, the quenching efficiency by O_2 decreased as the monitoring wavelength shifted to red, indicating an inhomogeneous distribution of Py fluorophore and/or oxygen accessibility. The inhomogeneous distribution of Py in GA-MC was confirmed by fluorescence anisotropy measurements, whose average value $\langle r \rangle$ was dependent on the spectral region, as shown in Table 2. At the blue-edge range (370 – 390 nm) of the Py emission, the $\langle r \rangle$ for microcapsule solutions was slightly larger than that in water. However, in the region between 400-430 nm, the $\langle r \rangle$ only increased in GA microcapsules, indicating a more rigid microenvironment. Therefore, the quenching efficiency was estimated using the classical Stern-Volmer (SV) equation 5, with Φ_0/Φ as the fluorescence quantum yield ratio (\equiv spectral area ratio) in absence and presence of oxygen, respectively, with $\langle K_{SV} \rangle$ as the integrated or average SV quenching constant.

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + \langle K_{SV}^{O_2} \rangle [O_2] \quad (5)$$

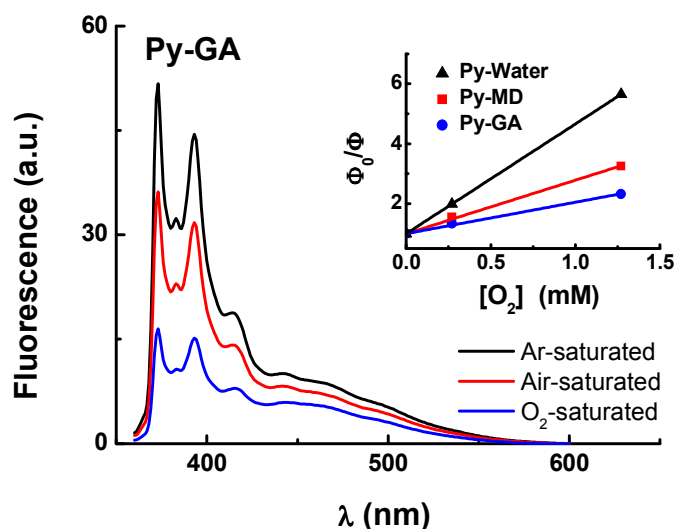


Figure 4. Fluorescence quenching of pyrene ($\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm) by dissolved molecular oxygen in gum arabic microcapsule solutions. **Inset:** Stern-Volmer plot (eq. 5) in water, gum arabic and maltodextrin microcapsule solutions.

Table 2. Average Py fluorescence anisotropy (r) and quenching by molecular oxygen in water and microcapsule solutions prepared with gum arabic (GA) and maltodextrin 20DE (MD).

Solution	$\langle r \rangle$		K_{SV} (L.mol ⁻¹)	$\langle \tau_0 \rangle$ (ns)	$\langle k_Q^{O_2} \rangle \times 10^{-9}$ (L.mol ⁻¹ s ⁻¹)
	(370-390 nm)	(400-430 nm)			
Water	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	3658 ± 90	202 ± 7	18 ± 0.5
MD-MC	0.010 ± 0.002	0.007 ± 0.002	1784 ± 30	165 ± 5	10 ± 0.3
GA-MC	0.011 ± 0.002	0.017 ± 0.004	1048 ± 40	196 ± 9	5.3 ± 0.3

The inset of Figure 4 shows the linearity of the SV plots in microcapsule solutions, and it is possible to observe that the quenching efficiency is higher in homogeneous water than in microcapsule solutions, as indicated by the $\langle K_{SV} \rangle$ values reported in Table 2. By definition, K_{SV} is the product between the bimolecular quenching rate constant, k_Q , and the fluorescence lifetime of the fluorophore in the absence of quencher, τ_0 , e.g. $K_{SV} = k_Q \times \tau_0$. In the microcapsule solutions, the fluorescence lifetime of Py is expected to be rather complex because of the inhomogeneous distribution of Py in the microcapsules. Under our experimental set-up conditions, we were only able to estimate the average lifetime of Py, i.e. $\langle \tau_0 \rangle$, Table 2, by the monoexponential fitting of the fluorescence decay of Py monitored at 375 nm (data not shown). Thus, the calculated average quenching rate constant $\langle k_Q^{O_2} \rangle$ indicated lower quenching efficiency in microcapsules than in water solutions, Table 2. This result suggests a barrier effect for the accessibility of O_2 to the Py location in the microcapsule, being this effect higher in GA than in MD microcapsules.

Quenching of singlet oxygen. The inset of Figure 5 shows the typical phosphorescence signal of 1O_2 obtained after 532 nm laser excitation of RB in air-saturated acetonitrile solutions. In all cases, the decay rate constant of 1O_2 , k_Δ observed increased with the increment of the concentration of the antioxidant molecules [AOx], without any major changes of the initial phosphorescence signal I_0 . Thus, the deactivation of 1O_2 occurs without changes on the efficiency of the photosensitized generation of 1O_2 by RB. The decay portion of the transient was fitted with the first-order function $I(t) = I_0 \times \exp(-k_\Delta t)$, and the quality of the monoexponential fitting was evaluated by the uniformity of the residual values, inset of the Figure 5. The variation of k_Δ with the AOx (\equiv quencher) concentration, allowed the calculation of the rate constant values for the total quenching (chemical + physical) by the AOx compounds, k_Q^{AOx} , according to eqn. 6.

$$k_\Delta = k_\Delta^0 + k_Q^{AOx} [AOx] \quad (6)$$

where $k_{\Delta}^0 = 1/\tau_{\Delta}^0$ represents the inverse of the lifetime of $^1\text{O}_2$ in the solvent without AOx, which, in the present case, was $\tau_{\Delta}^0 = 65 \pm 3 \mu\text{s}$ and $76 \pm 3 \mu\text{s}$ in D_2O and acetonitrile, respectively. Figure 5 shows the plots of eqn. 6 for the quenching of $^1\text{O}_2$ by AOx in acetonitrile solutions, and the calculated $k_{\text{Q}}^{\text{AOx}}$ values are shown in Table 3.

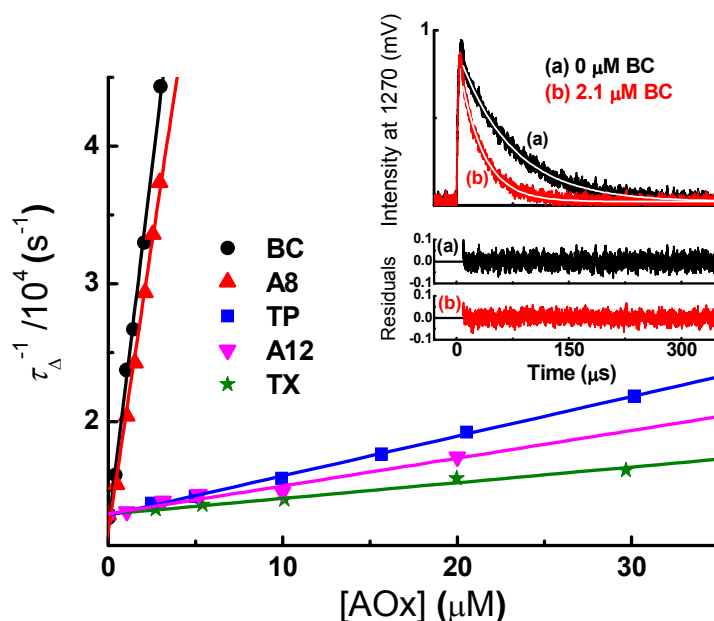


Figure 5. Plot of eqn. 6 for the quenching of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by antioxidants (AOx) in acetonitrile solutions. **Inset:** phosphorescence decay of $^1\text{O}_2$ in the absence and presence of β -carotene (BC) and the respective residual values for the monoexponential fitting.

Table 3 Rate constant values for the total quenching of $^1\text{O}_2$ by antioxidant quenchers (AOx) in acetonitrile and by GA and MD-microcapsules in D_2O solution.

AOx (c.d.b.) ^a	$k_{\text{Q}}^{\text{AOx}} (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}) \times 10^{-7}$		
	Acetonitrile ^b	GA-MC ^c	MD-MC ^{b, c}
TX (3)	11±1 (6.5±0.5) ^c	6.6 ± 0.3 ^d	6.9 ± 0.2
TP (3)	29 ± 1	4.1 ± 0.2 ^d	5.5 ± 0.2
BC (11)	1040 ± 35	5.1 ± 0.2 ^d	8.6 ± 0.4
A8 (10)	836 ± 30	5.5 ± 0.4 ^d	40 ± 2
A12 (8)	21 ± 2	5.4 ± 0.1 ^d	8.2 ± 0.3
None ^e	--	2.7 ± 0.2 ^b	<0.009 ± 0.001

^a c.d.b. = number of conjugated double bonds

^{b, d} Calculated with eqns. 6 and 7, respectively

^c in D_2O solutions

^e Microcapsules without AOx

The present data was in agreement with previously reported values.^{2,8-12} The quenching mechanisms of $^1\text{O}_2$ by carotenoids and tocopherol derivatives are well characterized, being governed by electronic energy-transfer (EET), in the case of carotenoids, and by charge-transfer (CT) processes for tocopherol derivatives.¹ Normally, the quenching of $^1\text{O}_2$ by EET mechanism is almost diffusion-controlled (e.g. $k_{\text{Q}} \approx 10^9\text{-}10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) when the triplet state energy of the quencher is smaller than the excitation energy of $^1\text{O}_2$, i.e. 94 kJ/mol. For carotenoids, the main quenching process is physical, producing $^3\text{O}_2$ and the triplet excited state of the carotenoid ($^3\text{Car}^*$) that quickly returns to the ground state by nonradiative processes. This condition is almost fully achieved for carotenoids with more than 9 conjugated double bonds (c.d.b.), while the k_{Q} value decreases with the reduction of the c.d.b. number,^{12,13} as observed for the carotenoid series BC, A8, and A12 in Table 3. Interestingly, the rate constant for the chemical reaction of $^1\text{O}_2$ with carotenoids and polyenes is independent on the number of c.d.b., i.e. $k_{\text{c}} \approx 1 \times 10^6$

$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$,^{13,34} indicating similar activation barrier for the addition reaction of $^1\text{O}_2$ into the c.d.b. system.

Instead, in the CT-induced deactivation, an electron donation, from tocopherol derivatives to $^1\text{O}_2$, forms a singlet excited state complex (exciplex).⁸⁻¹⁰ This singlet exciplex mainly decays by the intersystem crossing to a triplet CT-ground state complex, which finally dissociates to the ground state tocopherol and $^3\text{O}_2$. Both k_Q and k_c values are dependent on the electron donor ability of the quencher and solvent properties, increasing with pH and polarity.⁸⁻¹⁰

In microencapsulated solutions, the decay of $^1\text{O}_2$ in the presence of both “empty” and AOx-filled microcapsules of GA, or MD, was mono-exponential. In addition, the efficiency of the photosensitized generation of $^1\text{O}_2$ by RB in microcapsule D_2O solutions was almost the same as that in homogeneous D_2O . It has been reported that the rate of entrance and exit of both $^3\text{O}_2$ and $^1\text{O}_2$ in micellar pseudo-phases is higher than $1\times 10^7 \text{ s}^{-1}$, being at least two orders of magnitude higher than the decay of $^1\text{O}_2$ in D_2O or in hydrocarbon media, given that, under this condition, a common first-order decay for $^1\text{O}_2$ should be observed.³⁵ Apparently, similar exchange features of $^1\text{O}_2$ between microcapsules and bulk water can be considered. Figure 6A shows the plots of eqn. 6 for the quenching of $^1\text{O}_2$ by “empty” microcapsules of GA, or MD, in D_2O solutions, using the bulk molar concentration of the respective biopolymer. The plots were linear and the results demonstrate that GA with $k_Q^{\text{GA}} = 2.7\times 10^7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ is a $^1\text{O}_2$ quencher which is almost 300 times more efficient than MD microcapsules, Table 3. This large difference can be related with the presence of amino acids, such as histidine (His), and tyrosine (Tyr) residues in the glycoprotein moiety of GA.³¹ These amino acid residues quench $^1\text{O}_2$ in neutral aqueous media with k_Q of $4\times 10^7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $2.7\times 10^7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively.^{2,9,36} On the contrary, the very weak $^1\text{O}_2$ quenching by MD ($k_Q^{\text{MD}} = 9\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) can be associated with the presence of C–H and O–H residues of the polysaccharide, which increase the collisional deactivation of $^1\text{O}_2$ that proceeds *via* conversion of the electronic excitation energy into vibrational energy.¹ Thus, the intrinsic quenching contribution by MD can be neglected when compared with those

produced by the microencapsulated AOx (vide infra). However, for GA microcapsules, the intrinsic quenching of $^1\text{O}_2$ by the wall material is additive with the quenching contribution given by the AOx microencapsulated. Thus, the quenching contribution due to the microencapsulated AOx only is obtained by eqn. 7:

$$k_{\Delta} - k_{\text{Q}}^{\text{GA}}[\text{GA}] = k_{\Delta}^0 + k_{\text{Q}}^{\text{AOx}}[\text{AOx}] \quad (7)$$

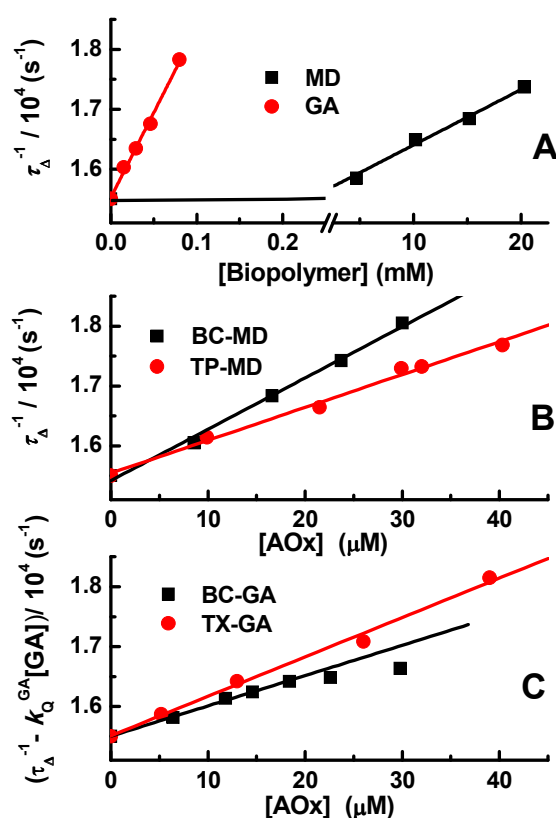


Figure 6. Quenching of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in D_2O by (A) “empty” microcapsules of gum arabic (GA) or maltodextrin 20DE (MD), eqn. 6; (B) BC-MD and TP-MD microcapsules, eqn. 6, (C) BC-GA and TX-GA microcapsules, eqn. 7. BC: β -carotene, TP: tocopherol, TX: trolox.

Figure 6B and 6C shows the plots of eqn 6 and 7 for the quenching of $^1\text{O}_2$ by AOx in MD and GA microcapsule in D_2O solutions, respectively. As compared with homogeneous solutions, the quenching efficiency by AOx in all microcapsule solutions is reduced, suggesting that the wall material induces a barrier effect for the accessibility of $^1\text{O}_2$ to the location of the AOx in the microcapsule structure. This effect is also related with the hydrophilic-hydrophobic balance of the AOx molecules. For instance, in both microcapsule systems the $k_{\text{Q}}^{\text{AOx}}$ value for TX, which is the most polar AOx of the series, is very close to that observed in homogeneous D_2O solutions. However, for BC, the most apolar AOx of the series, the $k_{\text{Q}}^{\text{AOx}}$ value in microcapsules is almost two-orders of magnitude smaller than that in homogeneous acetonitrile, Table 3. These results indicate that the location of the AOx in the microcapsule structure depends on the nature of the AOx and, therefore, play a role in the quenching efficiency of $^1\text{O}_2$. This effect is best visualized by comparing the ratio of the quenching rate constants by AOx observed in microcapsule and acetonitrile solutions, e.g. $(k_{\text{Q}}^{\text{AOx}})_{\text{MC}}/(k_{\text{Q}}^{\text{AOx}})_{\text{ACN}}$, Figure 7. This plot indicates that, for carotenoids derivatives, this ratio is larger in MD than in GA microcapsule, and for the same wall material the ratio increases as the AOx molecule reduces its molecular size and hydrophobicity, e.g. TX > TP and A12 > A8 > BC.

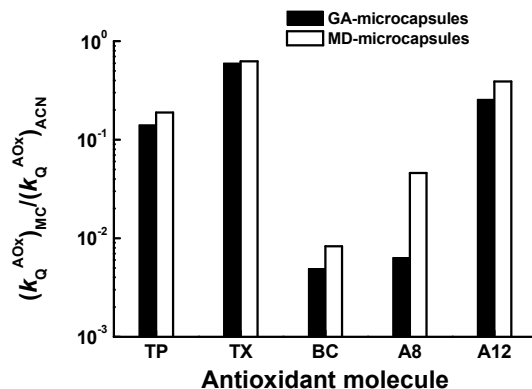


Figure 7. Ratio of the rate constant quenching of $^1\text{O}_2$ by antioxidant quenchers (AOx) between microcapsule of gum arabic (GA) or maltodextrin 20DE (MD) in D_2O and acetonitrile solutions. TP: tocopherol, TX: trolox, BC: β -carotene, A8: apo-8'-carotenal, and A12: apo-12'-carotenal.

The above conclusions also agree with the microcapsule properties information obtained from the Py fluorescence experiments, as discussed above. The Py excimer formation, the I_I/I_{III} band ratio, the average anisotropy $\langle r \rangle$, and the fluorescence quenching by ground state oxygen $^3\text{O}_2$ indicated that the hydrophobic domains in GA are less polar, more rigid and compacted than in MD microcapsules, improving the solubilization of apolar molecules and reducing the accessibility of oxygen molecules.

In summary, the present study demonstrated that the properties of the hydrophobic domains in spray-drying microcapsules are dependent on the nature of the biopolymer used as wall material, and the location of AOx molecules is also dependent on its affinity with these sites. In addition, the quenching of $^1\text{O}_2$ by microencapsulated AOx molecules is governed by compartmentalization effects, which result in lower accessibility of $^1\text{O}_2$ as compared with homogenous media. This effect decreases as the polarity of the quencher molecule increases, being tocopherol derivatives less influenced than carotenoids derivatives. In fact, in case AOx encapsulation is necessary, GA is a more convenient wall material than MD,

since GA provides higher microencapsulation efficiency and shows a greater contribution to the total antioxidant activity in the system, as compared to MD.

Acknowledgments

The authors thank the Argentinean Funding Agencies CICyT-UNSE, CONICET, and ANPCyT; and the Brazilian Funding Agencies FAPESP and CAPES for their financial support.

References

1. Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685-1757.
2. Lissi, E. A.; Encinas, M. V.; Lemp, E.; Rubio, M. A. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 699-723.
3. Clennan, E. L.; Pace, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6665-6691.
4. Min, D. B.; Boff, J. M. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2002**, *1*, 58-72.
5. Montenegro, M. A.; Nunes, I. L.; Mercadante, A. Z.; Borsarelli, C. D. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 323-329.
6. Wilkinson, F. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 851-858.
7. Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O. I. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 601-617.
8. Gorman, A. A.; Gould, I.; Hamblett, I.; Standen, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6956-6959.
9. Bisby, R. H.; Morgan, C. G.; Hamblett, I.; Gorman, A. A. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7454-7459.
10. Nonell, S.; Moncayo, L.; Trull, F.; Amat-Guerri, F.; Lissi, E. A.; Soltermann, A. T.; Criado, S.; García, N. A. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **1995**, *29*, 157-162.

-
11. Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **1991**, *11*, 41-47.
 12. Baltschun, D.; Beutner, S.; Briviba, K.; Martin, H. D.; Paust, J.; Peters, M.; Rover, S.; Sies, H.; Stahl, W.; Steigel, A.; Stenhorst, F. *Liebigs Annalen-Recueil* **1997**, *9*, 1887-1893.
 13. Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 353-361.
 14. Deshpande, S. S.; Deshpande, U. S.; Salunkhe, D. K. In *Food antioxidants – technological, toxicological, and health perspectives*; Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1996; p 361-469.
 15. Mercadante, A. Z. In *Food colorants – chemical and functional properties*; Socaciu, C., Ed.; CRC: New York, 2008; p 177-192.
 16. Shahidi, F.; Han, X. Q. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33*, 501-547.
 17. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1107-1121.
 18. Drusch, S.; Berg, S. *Food Chem.* **2008**, *109*, 17-24.
 19. Lokuwan, J. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 928-935.
 20. Desobry, S. A.; Netto, F. M.; Labuza, T. P. *J. Food Process Preserv.* **1999**, *23*, 39-55.
 21. Minemoto, Y.; Hakamata, K.; Adachi, S.; Matsuno, R. *J. Microencapsul.* **2002**, *19*, 181-189.
 22. Barbosa, M. I. M. J.; Borsarelli, C. D.; Mercadante, A. Z. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 989-994.

-
23. Nunes, I. L.; Mercadante, A. Z. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2007**, *50*, 893-900.
24. Davies, B. H. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*; Goodwin, T. W., Ed.; Academic Press: London, 1976; Vol. 2, p 38-165.
25. Dabestani, R.; Ivanov, I. N. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 10-34.
26. Dong, D. C.; Winnik, M. A. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2560-2565.
27. Winnik, F. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 587-614.
28. Vieyra, F. E. M.; Zampini, I. C.; Ordoñez, R. M.; Isla, M. I.; Boggetti, H. J.; De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Alvarez, R. M. S.; Borsarelli C. D. *Free Radic. Res.* **2009**, *43*, 553-564.
29. Rosenberg, M.; Kopelman, I. J.; Talmon, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1288-1294.
30. Williams, P. A.; Phillips, G. O. In *Handbook of hydrocolloids*; Phillips, G. O.; Williams, P. A., Eds.; CRC: Cambridge, 2000; p 155-168.
31. Renard, D.; Lavenant-Gourgeon, L.; Ralet, M.-C.; Sanchez, C. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2637-2649.
32. Kennedy, J. F.; Noy, R. J.; Stead, J. A.; White, C. A. *Starch/Stärke* **1985**, *37*, 343-351.
33. Birks, J. B. *Rep. Prog. Phys.* **1975**, *38*, 903-974.
34. Borsarelli, C. D.; Michne, M.; La Venia, A.; Vieyra, F. E. M. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1313-1318.
35. Lee, P. C.; Rodgers, M. A. J. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 4894-4898.
36. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 663-1021.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho mostram que o uso de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS) foi uma ferramenta útil e fundamental para a determinação da composição de carotenoides de nêspera, jaca e jambolão, assim como para a determinação da composição de antocianinas e outros compostos fenólicos de jambolão.

No estudo com os diferentes cultivares de nêspera foi possível demonstrar a influência do fator genético na composição de carotenoides, uma vez que todas as frutas foram provenientes do mesmo pomar. Entre os cultivares analisados, a principal diferença foi relacionada aos conteúdos de carotenoides, uma vez que os perfis de carotenoides foram similares para quatro dos cinco cultivares avaliados. Os valores de pró-vitamina A indicaram que os frutos de nêspera, principalmente aqueles pertencentes aos cultivares Mizauto, Mizuho e Mizumo, representam uma boa fonte dessa vitamina.

Em relação à composição de carotenoides de jaca, 18 carotenoides foram identificados, sendo que destes, 14 foram relatados pela primeira vez nessa fruta. Entre os lotes analisados, as diferenças ocorreram tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, sendo a principal diferença relacionada à proporção de luteína. Esses resultados podem ser um indicativo de que os lotes comercialmente disponíveis representam diferentes cultivares ou variedades de jaca, ou ainda que foram produzidos sob diferentes condições de cultivo.

Neste trabalho, pela primeira vez foi relatada a composição de carotenoides e compostos fenólicos de jambolão, com exceção das antocianinas. O perfil de carotenoides se caracterizou pela presença de *all-trans*-luteína e *all-trans*- β -caroteno e seus respectivos isômeros *cis*, que em conjunto representam 7 dos 13 carotenoides encontrados, perfazendo 84,6 % do total de carotenoides. Entre as agliconas dos flavonoides não antociânicos, mirecetina foi o único flavonol encontrado, sendo identificados também 2 precursores desse flavonol, que

representam a classe dos flavanonóis (ou dihidroflavonóis). As antocianinas foram compostas por cinco agliconas diferentes: delphinidina, petunidina, malvidina, cianidina e peonidina. Foi marcante a presença de diglucosídeos, tanto nas antocianinas como em outros flavonoides. Além disso, a atividade antirradical livre do extrato funcional de jambolão foi maior em valores maiores de pH. Em relação à proteção frente ao oxigênio singlete, o extrato funcional apresentou características antioxidantes superiores a de outras frutas vermelhas.

Os resultados obtidos no estudo da atividade antioxidante de cianidina 3-glucosídeo incorporada em lipossomas mostraram que todas as formas dessa antocianina em equilíbrio nas condições de pH estudadas foram capazes de prolongar o período de indução da oxidação lipídica iniciada por radicais livres, em sistema mimetizador de membranas. A mistura de hemiacetais e/ou chalconas, junto com bases quinonoidais, que estão presentes em meio neutro, apresentaram atividade 2,6 vezes maior ($EC_{50} = 9,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$) que a mistura de cátion flavílium e hemiacetais, presente em pH 3,1 ($EC_{50} = 23,6 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$).

Por fim, o estudo envolvendo microencapsulação de padrões de carotenoides, assim como de trolox e tocoferol, demonstrou que os domínios hidrofóbicos nas microcápsulas obtidas por *spray-drying* foram dependentes da natureza do polímero usado como material de parede (goma arábica ou maltodextrina 20DE). Além disso, a localização das moléculas do antioxidante depende da afinidade do composto com essas micro-regiões. A desativação total de oxigênio singlete (1O_2) pelos antioxidantes encapsulados foi influenciada por efeitos de compartimentalização, que provocaram menor acessibilidade do 1O_2 quando comparado ao meio homogêneo. Esse efeito foi inversamente proporcional à polaridade do antioxidante, sendo que os carotenoides são mais influenciados que tocoferol e trolox. De qualquer forma, no caso da encapsulação desses antioxidantes ser necessária, goma arábica é mais conveniente que maltodextrina como material de parede, uma vez que a goma arábica proporciona uma maior eficiência de microencapsulação e apresenta maior contribuição para a atividade antioxidante total no sistema, quando comparada com a maltodextrina.