

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE PADRÕES OBTIDOS  
A PARTIR DO COLORÍFICO COMERCIAL PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM  
MEXILHÕES**

Dissertação Apresentada como  
requisito à obtenção do grau de  
Bacharelado em Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

**VANICE FÁTIMA SCHNEIDER**

FLORIANÓPOLIS  
2004

**VANICE FÁTIMA SCHNEIDER**

**DESENVOLVIMENTO DE PADRÕES PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
CAROTENÓIDES EM MEXILHÕES OBTIDOS A PARTIR DO  
COLORÍFICO COMERCIAL**

Dissertação apresentada como  
requisito para obtenção do grau  
de Bacharelado em Química

---

Coordenadora de Estágio: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iolanda da Cruz Vieira

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

---

Co-orientador: Dr. Renato Rodrigues Neto

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iolanda da Cruz Vieira

---

Aluna de Doutorado:

FLORIANÓPOLIS  
2004

## AGRADECIMENTOS

Aos meus tios Maria e Bruno Schneider e às minhas primas Cleonice e Marta pelo apoio e incentivo em todos os momentos e pelas palavras de conforto e encorajamento nos momentos difíceis.

Ao meu orientador pela oportunidade e confiança proporcionadas; e ao meu co-orientador pela amizade, dedicação e paciência em momentos de dificuldade, e por toda motivação e atenção nos trabalhos experimentais.

Aos membros da banca pela atenção prestada ao meu trabalho.

A todos os professores que colaboraram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Ao técnico de laboratório Sr. Ângelo e ao Prof. Miguel pelas ajudas prestadas.

Aos colegas dos laboratórios 214 e 216 pela acolhida ao grupo, pelas orientações e colaborações neste trabalho, Sandro, Marcelo e Fabrício. Carlos e Eduardo pela amizade, companheirismo e pelos risos que muitas vezes serviram de incentivo. À todos por propiciarem um excelente ambiente de trabalho e profissionalismo.

Aos amigos Jandira e Edimilson pela compreensão e carinho, com saudade.

Às amigas Juliana, Fernanda, Fernanda Almeida, Lia, Denise, Thalita, Cristiane, Thais, Cíntia, Sheila, Nicole em especial à Andréia. Valeu pessoal!

Aos fiéis amigos, Sandro Brasil e Rogério Lunkes, que sempre me deram a mão.

Aos colegas de curso pelos incansáveis e inesquecíveis dias que juntos passamos.

Às minhas colegas de apartamento pela compreensão e cooperação.

À todos que de alguma forma me ajudaram a vencer os desafios para mais esse importante passo, mesmo os que por algum motivo me criticaram.

À minha mãe pelas ajudas prestadas e também pelo não em alguns momentos que colaboraram para o meu crescimento. Com profunda saudade agradeço ao meu pai, meu protetor, pelas boas lembranças e exemplo de vida que me deixou (em memória).

E a Deus. Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Maricultura e impacto ambiental .....	01
1.2. Padrão para Quantificação de Carotenóides .....	02
1.3. Carotenóides .....	04
1.3.1. Estrutura e propriedades dos Carotenóides .....	04
1.3.2. Extração e separação dos Carotenóides .....	05
1.3.3. Caracterização e Purificação .....	07
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	08
2.1. Objetivos Gerais .....	08
2.2. Objetivos Específicos .....	08
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	08
3.1. Limpeza da Vidraria .....	08
3.2. Solventes e Reagentes Utilizados .....	09
3.3. Extração e Separação dos Carotenóides do Urucum .....	09
3.4. Purificação e Caracterização .....	12
3.4.1. Derivado Dimetilado .....	13
3.4.2. Derivado Dietilado .....	14
3.4.3. Derivado n-Propilado .....	15
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
4.1. Purificação dos Derivados di-alquilados .....	17
4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	21
4.3. Ressonância Magnética Nuclear .....	25
4.4. Considerações Gerais .....	27
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Teores de carotenóides em amostras de colorífico .....	03
<b>Tabela 2</b> - Relação dos solvente e reagentes utilizados .....	09
<b>Tabela 3</b> - Tabela dos derivados obtidos e seus picos de absorção .....	12
<b>Tabela 4</b> - Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto <b>1</b> .....	13
<b>Tabela 5</b> - Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto <b>1</b> .....	13
<b>Tabela 6</b> - Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto <b>2</b> .....	14
<b>Tabela 7</b> - Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto <b>2</b> .....	15
<b>Tabela 8</b> - Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto <b>3</b> .....	15
<b>Tabela 9</b> - Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto <b>3</b> .....	15
<b>Tabela 10</b> - Deslocamento de prótons .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Perna-perna</i> – Macho .....	01
<b>Figura 2</b> – <i>Perna-perna</i> – Fêmea .....	01
<b>Figura 3</b> - Estrutura química dos isômeros bixina e norbixina .....	03
<b>Figura 4</b> - Mecanismo de Saponificação .....	06
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de Esterificação com Cloreto de Acetila .....	07
<b>Figura 6</b> - Fluxograma para separação dos derivados dialquilados .....	11
<b>Figura 7</b> - Estrutura química dos compostos da Tabela 4 e seu principal isômero-cis .....	12
<b>Figura 8</b> - Espectro da primeira purificação em coluna do composto <b>1</b> .....	17
<b>Figura 9a</b> - Espectros da segunda purificação em coluna do composto <b>1</b> .....	18
<b>Figura 9b</b> – Espectro da segunda purificação em coluna do composto <b>1</b> .....	18
<b>Figura 10</b> - Placa de sílica eluída com hexano/acetato de etila 4:1, após a segunda purificação do composto <b>1</b> .....	19
<b>Figura 11</b> - Espectro da primeira purificação em coluna do composto <b>2</b> .....	19
<b>Figura 12</b> - Espectro da segunda purificação em coluna do composto <b>2</b> .....	20
<b>Figura 13</b> - Espectro da primeira purificação em coluna do composto <b>3</b> .....	21
<b>Figura 14</b> - Espectro da segunda purificação em coluna do composto <b>3</b> .....	21
<b>Figura 15</b> - Cromatograma do composto <b>1</b> .....	22
<b>Figura 15a</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 3,669 min .....	22
<b>Figura 15b</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 3,843 min .....	22
<b>Figura 15c</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 8,360 min .....	22
<b>Figura 15d</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 8,850 min .....	22
<b>Figura 16</b> – Cromatograma do composto <b>2</b> .....	23
<b>Figura 16a</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 9,733 min .....	23
<b>Figura 16b</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 10,415 min .....	23
<b>Figura 16c</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 11,218 min .....	24
<b>Figura 16d</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 11,829 min .....	24
<b>Figura 17</b> – Cromatograma do composto <b>2</b> .....	24
<b>Figura 17a</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 11,396 min .....	24
<b>Figura 17b</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 12,041 min .....	24
<b>Figura 17c</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 14,444 min .....	25
<b>Figura 17d</b> - Espectro UV/visível do pico com $t_R$ 15,219 min .....	25
<b>Figura 18</b> - Espectro de RMN para o composto <b>2</b> .....	27

## RESUMO

O cultivo de mexilhões *Perna-perna* vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, assim tem sido foco de vários estudos de metais pesados no Brasil, mas não há nenhum estudo em relação aos lipídios e carotenóides dessas espécies. Nos mexilhões existe uma diferença de coloração, que é usada na distinção dos sexos, que está relacionada com as fases de gametogênese e os responsáveis por essa diferença de coloração são os carotenóides. O estudo desse processo é essencial para a otimização na produção de sementes para o cultivo.

Uma limitação para esse estudo é a falta de um padrão, de fácil aquisição e baixo custo. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi a extração, purificação e caracterização de um padrão para auxiliar na quantificação de carotenóides, incluindo os de mexilhões. Devido a disponibilidade comercial, escolheu-se extrair os carotenóides do colorífico que é feito a partir da semente do urucum (*Bixa Orellana L.*). A partir da bixina e norbixina, carotenóides majoritários do urucum, obter três derivados dialquilados diferentes, com diferentes tempos de retenção em cromatografia. A separação e purificação foi realizada em cromatografia de coluna e após injetada em HPLC para avaliar a pureza. O método mostrou-se eficiente para alguns compostos, porém alguns picos de isômeros ainda foram encontrados nos espectros de cromatografia. Esses compostos podem não ter sido separados satisfatoriamente do composto desejado, Dialquil (9Z,) – 6,6'-diapocaroteno – 6,6'-dioato **1**, ou estarem se formando durante o processo de separação e purificação, devido a alguns fatores não recomendados como a presença de luz, oxigênio e calor. O derivado dietilado foi o que teve maior quantidade de composto em relação as suas impurezas. O emprego da técnica de cromatografia em HPLC como ferramenta de separação é uma das alternativas para a obtenção de melhores resultados. Um estudo posterior necessário deve ser a avaliação do isômero dimetil (9Z, 9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, em relação ao composto **1**, a fim de verificar qual dos dois compostos é o mais estável no solvente em que se trabalha.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Maricultura e impacto ambiental

No Brasil, a aquicultura apresenta-se como uma alternativa promissora na produção de alimentos, dado ao grande potencial em termos de espécies adaptadas, à abundância de recursos naturais e ao clima favorável (Marchi, 1997). Só em Santa Catarina o cultivo de mexilhões *Perna perna* aumentou de 7.500 toneladas, em 1997 (Costa *et al.*, 1998), para 9.460 toneladas em 1999 (Roczanski *et al.*, 2000). O *Perna perna* filtra 4,0 mL (H<sub>2</sub>O) h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>(massa seca; Anandraj *et al.*, 2002) e considerando que 80% da massa dos mexilhões é água, essa espécie filtra cerca de 3,23.10<sup>10</sup> metros cúbicos de água em cada seis meses no estado de Santa Catarina (assumindo um estoque estável de 9.460 toneladas). O *Perna perna* tem sido foco de vários estudos de metais pesados no Brasil (Costa *et al.*, 2000; Avelar *et al.*, 2000; Curtius *et al.*, 2003;). Por outro lado, não existe nenhum estudo em relação aos lipídios e carotenóides dessas espécies.

Nos mexilhões existe uma diferença de coloração entre machos (branco) e fêmeas (vermelha), conforme Figura 01 e 02, sendo esta diferença usada na distinção dos sexos (Depto de Aquicultura, UFSC - Aimê Raquel, comunicação pessoal). Em relação à gametogênese, as fêmeas são mais produtivas. O conhecimento dos processos de gametogênese e posterior desova é essencial para a otimização na produção de sementes, que é um processo limitante nas fazendas de mexilhões. Entretanto, o conhecimento dos processos bioquímicos que levam a fêmea a ter uma maior produção de gametas pode aumentar a produção de sementes através de um controle bioquímico. Assim, a análise de carotenóides (compostos responsáveis pela cor) deve ser o primeiro passo neste sentido.



**Figura 1** – *Perna-perna* – Macho  
(Fotos: Prof. Jaime F. Ferreira )



**Figura 2** – *Perna-perna* – Fêmea



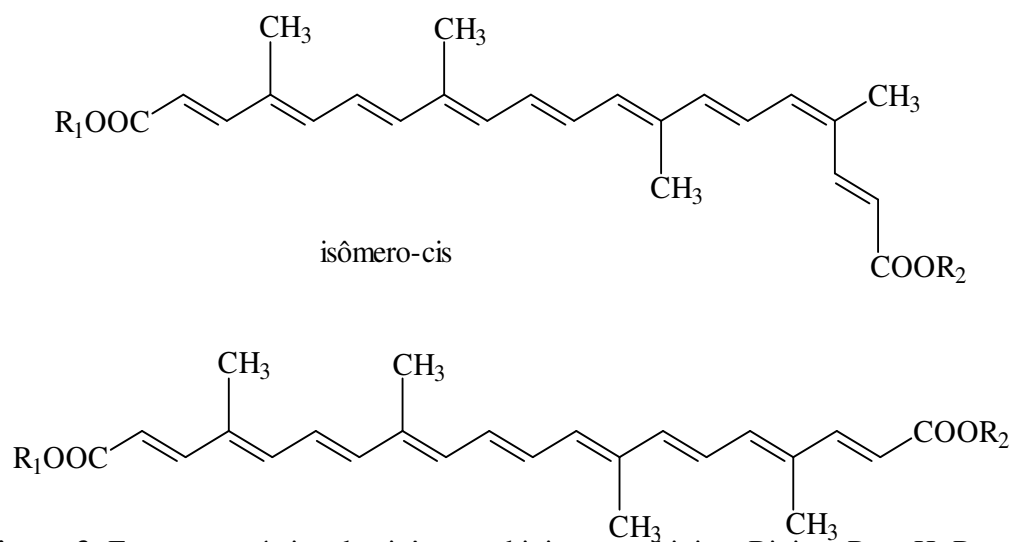
## 1.2. Padrão para Quantificação de Carotenóides

A difícil aquisição de um padrão para quantificação de carotenóides e o alto custo mostram a necessidade de se obter um padrão acessível para quantificação dos mesmos. Isto requer estudos para o isolamento, caracterização e purificação de um composto que seja facilmente encontrado no mercado, com certa abundância, que possa ser obtido com pureza de até 70% (referência Sigma Aldrich) e que sirva como padrão interno. O custo de um padrão para carotenóides é aproximadamente US\$ 48,00 por miligrama (referência Sigma Aldrich, 2004).

Devido a disponibilidade comercial, escolheu-se extrair carotenóides do colorífico, que é feito a partir da planta urucum (*Bixa Orellana L.*). A vantagem do urucum, é que seus pigmentos são estáveis à luz e ao calor, resistindo à temperaturas de até cerca de 100°C (Guimarães, 1989).

Dentre os corantes naturais o urucum é o mais usado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo (Ghiraldini, 1989). Do total de sementes de urucum produzido no Brasil, cerca de 25% são utilizados na preparação de extratos lipo e hidrossolúveis e o restante é usado na fabricação do colorífico (Ghiraldini, 1989).

O urucueiro (*Bixa orellana L.*) é uma planta nativa da América Tropical (Preston e Rickard, 1980). Suas sementes são cobertas por uma resina vermelha que contém como pigmento principal o carotenóide bixina, (monometil éster-(6,6')-Diapo- $\psi\psi$ -ácido carotenodiólico), (Figura 3; Mercadante, 1998; Preston e Rickard, 1980). A bixina perfaz cerca de 80 % dos carotenóides totais do urucum que é um dos ingredientes do colorífico. A norbixina (9Z-6,6'-Diapo- $\psi\psi$ -ácido carotenodiólico), Figura 03, produto de saponificação da bixina, é o pigmento principal das preparações hidrossolúveis, sendo encontrada em pequena quantidade nas sementes e nas preparações lipossolúveis (Mercadante, 1998; Preston e Rickard, 1980).



**Figura 3.** Estrutura química dos isômeros bixina e norbixina. Bixina:  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ; Norbixina:  $R_1 = R_2 = H$  (Preston e Rickard, 1980).

Mecadante (2001) analisou os carotenóides em sete marcas diferentes de colorífico. Todas continham bixina como carotenóide majoritário e norbixina em menor quantidade. A Tabela 01 mostra os teores de Bixina e Norbixina encontrados em diferentes marcas de colorífico. (Tocchini e Mercadante, 2001).

**Tabela 1** - Teores de carotenóides em amostras de colorífico (Tocchini e Mercadante, 2001)

Marcas	Bixina (mg.100g <sup>-1</sup> )	Norbixina (mg.100g <sup>-1</sup> )
A <sup>a</sup>	185 ± 11	5,9 ± 3,0
B <sup>a</sup>	229 ± 26	3,2 ± 1,0
C <sup>a</sup>	154 ± 18	2,1 ± 0,3
D <sup>b</sup>	320 ± 19	4,5 ± 0,4
E <sup>b</sup>	354 ± 10	6,6 ± 1,1
F <sup>c</sup>	202 ± 28	3,3 ± 0,6
G <sup>c</sup>	154 ± 1	3,6 ± 0,1

*Media e desvio padrão de <sup>a</sup>5 lotes, <sup>b</sup>3 lotes e <sup>c</sup>2 lotes*

A bixina perfaz cerca de 80% dos carotenóides totais da semente de urucum (Preston e Rickard, 1980).

### 1.3. Carotenóides

Os carotenóides são os pigmentos naturais mais difundidos nas plantas e animais. Eles são responsáveis pela coloração amarela, alaranjada e avermelhada de muitos alimentos, sendo largamente utilizados como pigmentos naturais não tóxicos (Britton, 1992).

Sendo lipofílicos, insolúveis em água e capazes de ligar com superfícies hidrofóbicas, os carotenóides são encontrados na natureza como soluções oleosas, dispersões coloidais ou complexados com proteínas; assim ocorrem tanto em meios lipídicos como em meios aquosos (Rodriguez-Amaya, 1997; Britton, 1992).

#### 1.3.1. Estrutura e propriedades dos Carotenóides

Os carotenóides possuem propriedades e exercem funções especiais, as quais estão intimamente ligadas às suas estruturas. A maioria destes pigmentos possui 40 átomos de carbono, ou seja, são tetraterpenos, acíclicos ou alicíclicos, formados por oito unidades isoprenóides (5 átomos de carbono) unidos pela ligação do tipo “cabeça-cauda”, exceto na posição central, onde a ligação é do tipo “cauda-cauda”, produzindo uma estrutura simétrica com reversão do plano de simetria no centro da molécula. Mais de 600 carotenóides naturais já foram isolados e caracterizados. O aspecto estrutural distintivo é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, que é freqüentemente referido como cadeia poliênica (Padula, 1999; Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya, 1984).

Os carotenóides podem ser classificados em dois grupos; os carotenos, que são hidrocarbonetos carotenóides, e os oxicarotenóides, que contém oxigênio além de carbono e hidrogênio. Os oxicarotenóides são genericamente conhecidos como xantofilas. Os substituintes oxigenados mais comuns são os grupos hidroxílicos e epóxidos. São também encontrados grupos aldeídicos (CHO), cetônico (C=O), carboxi (CO<sub>2</sub>H), carboximetóxi (CO<sub>2</sub>Me) e metoxi (Ome)(Rodriguez-Amaya, 1997; Britton, 1992). Os apocarotenóides, carotenóides de cadeia mais curta, são considerados produtos iniciais de degradação dos carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1997).

A cor do carotenóide é proveniente de um cromóforo constituído de uma cadeia de duplas ligações conjugadas responsável pela sua habilidade de absorver luz na região do visível. A intensidade de coloração aumenta do amarelo para o vermelho, com o

número de ligações duplas conjugadas, a exemplo do licopeno, que possui 11 duplas ligações conjugadas e apresenta coloração vermelha. A ciclização diminui o efeito das duplas ligações situadas no anel, portanto, carotenóides como o  $\beta$ -caroteno, que possui 11 duplas ligações conjugadas, apresenta coloração amarelada tendendo para o laranja, dependendo da concentração (Britton, 1992; Rodrigues-Amaya, 1984).

Os carotenóides geralmente ocorrem na natureza na forma trans, a configuração mais estável. A estabilidade de carotenóides depende de vários fatores: disponibilidade de oxigênio, temperatura, exposição à luz, acidez/alcalinidade e a própria estrutura (Padula, 1999; Rodriguez-Amaya, 1997; Britton, 1992).

O componente de coloração principal do urucum é o apocarotenóide cis-bixina (Monometil éster 9Z-(6,6')-Diapo- $\psi\psi$ -ácido carotenodiólico), o monometil ester do ácido dicarboxílico, cis norbixina. Cis-Bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares para o qual dá uma coloração laranja, mas é largamente insolúvel em óleo vegetal. Pode ser totalmente convertido para o isômero trans devido a sua instabilidade na forma isolada em solução (Scotter, 1994).

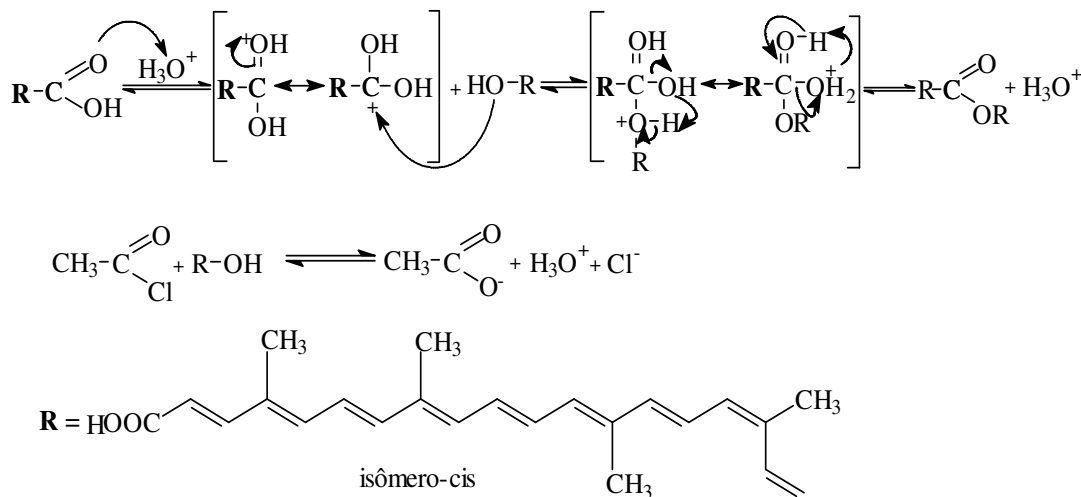
### **1.3.2. Extração e separação dos Carotenóides**

Muitos cuidados são necessários em trabalhos com carotenóides, porque mudanças estruturais não desejáveis podem ocorrer durante os passos de manipulação destes pigmentos. Todos os procedimentos que inevitavelmente causam riscos de oxidação, isomerização ou ambos, devem ser realizados o mais rápido possível (Britton, 1992).

Os carotenóides são moléculas altamente insaturadas e, portanto, susceptíveis à oxidação e isomerização. A cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis, é também a causa da sua instabilidade (Padula, 1999; Rodriguez-Amaya, 1997;). A presença de traços de oxigênio em amostras estocadas (até mesmo sob temperaturas negativas) e de peróxidos ou algum outro agente oxidante em extratos contendo carotenóides pode rapidamente promover a descoloração, ou formação de compostos como epóxidos ou apocarotenais. Carotenóides, ou extratos contendo estes, devem ser estocados em completa ausência de oxigênio, como sob vácuo ou em uma atmosfera inerte (nitrogênio) (Rodriguez-Amaya, 1997; Britton, 1992).



A proposta deste estudo é obter um derivado dialquilado da norbixina, que pode ser obtido através da esterificação com cloreto de acetila e álcool (Lillington *et al.*, 1980). O mecanismo da reação está representado na Figura 5.



**Figura 5** – Mecanismo de Esterificação com Cloreto de Acetila (Mc Murry, 1997).

### 1.3.3. Caracterização e Purificação

O uso da espectroscopia de UV/visível na caracterização de produtos naturais, particularmente dos carotenóides foi bastante documentado e incluiu vários estudos em pigmentos do urucum (Karrer and Jucker 1950, Lunde and Zechmeister, 1955; Zechmeister, 1960; Scott, 1964; Scotter *et al.*, 1994). Espectroscopia de Infra-vermelho (Lunde and Zechmeister, 1955) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  foi usada para caracterizar configurações *cis* e *trans* da metil bixina (Barber *et al.*, 1961; Scotter *et al.*, 1994).

Os carotenóides totais do urucum podem ser determinados através da leitura do extrato em espectrofotômetro (*Food Agriculture Organization*, 1996; Takahashi, 1987) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido empregada para separar Bixina e Norbixina (Lancaster e Lawrence, 1995; Rouseff, 1988; Takahashi, 1987).

Os carotenóides do colorífico, incluindo isômeros, são separados em HPLC, coluna  $\text{C}_{18}$  (Spherisorb ODS-2, 150mm x 4,6mm. Tamanho de partícula 3 $\mu\text{m}$ ), com fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , em 22 min, nos quais os picos apresentaram-se simétricos, sem cauda e espectrofotometricamente puros (Tocchini e Mercadante, 2001).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Extração, síntese e purificação de um padrão para carotenóides extraído do colorífico comercial, para auxiliar na quantificação dos carotenóides dos mexilhões *Perna-perna*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Extrair os pigmentos do colorífico comercial, proceder a saponificação dos mesmos e a separação da norbixina.
- Esterificação do carotenóide para obter compostos com diferentes tempos de retenção.
- Purificação e caracterização do carotenóide.

## 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O material utilizado neste experimento foi o colorífico comercial, geralmente utilizado em alimentos e que é composto principalmente de bixina e norbixina (Tocchini e Mercadante, 2001), do qual se extraiu os carotenóides. Após a extração procedeu-se a síntese para a obtenção dos compostos alquilados (metil, etil e n-propil), assim como a sua separação e purificação. Para a caracterização dos compostos utilizaram-se dados UV/visível,  $^1\text{H}$ -RMN comparados aos da literatura.

O material foi mantido ao abrigo da luz natural, mesmo durante a sua manipulação, armazenado sob refrigeração e em ambiente de nitrogênio.

### 3.1. Limpeza da Vidraria

A vidraria utilizada foi inicialmente lavada com detergente neutro, enxaguada abundantemente em água corrente e deixada imersa em solução de detergente-água (12 horas). Em seguida foi novamente enxaguada com água corrente e água destilada. Esta foi calcinada em mufla Quimis Mod Q 318-24 (450°C; 4 horas).

A vidraria utilizada que não pôde ser submetida a calcinação, como material volumétrico, foi seca à temperatura ambiente e após foram enxaguados com metanol e novamente secos à temperatura ambiente.

### 3.2. Solventes e Reagentes Utilizados

Na Tabela 2 foram discriminados os solventes e reagentes utilizados neste estudo, relacionado-se o seu grau de pureza e a marca ou fabricante.

**Tabela 2** - Relação dos solvente e reagentes utilizados.

Solvente / Reagente	Marca / Fabricante	Grau de Pureza
Metanol	Carlo Erba	HPLC
Diclorometano	Tedia	Pesticida
Acetona	Merck	HPLC
Acetato de Etila	Carlo Erba	HPLC
n-Hexano	Merck	Pesticida
Etanol	Nuclear	Analítico
n-Propanol	Merck	Analítico
Ácido Clorídrico	Synth	Analítico
Cloreto de Acetila	Fluka	Analítico
Hidróxido de Potássio	Nuclear	Analítico
Sulfato de Sódio Anidro	Nuclear	Analítico
Óxido de Magnésio	Vetec	Analítico
Sílicagel	Merck	Cromatografia
Algodão de Vidro	Synth	Analítico
Nitrogênio	White Martins	4.6
Acetonitrila	Carlo Erba	Pesticida
Ácido Acético	Nuclear	Analítico

### 3.3. Extração e Separação dos Carotenóides do Urucum

Foram preparadas duas extrações de aproximadamente 75,00 g (balança semi-analítica Núcleo PR 10) de colorífico comercial cada, secas em liofilizador (Heto Lab

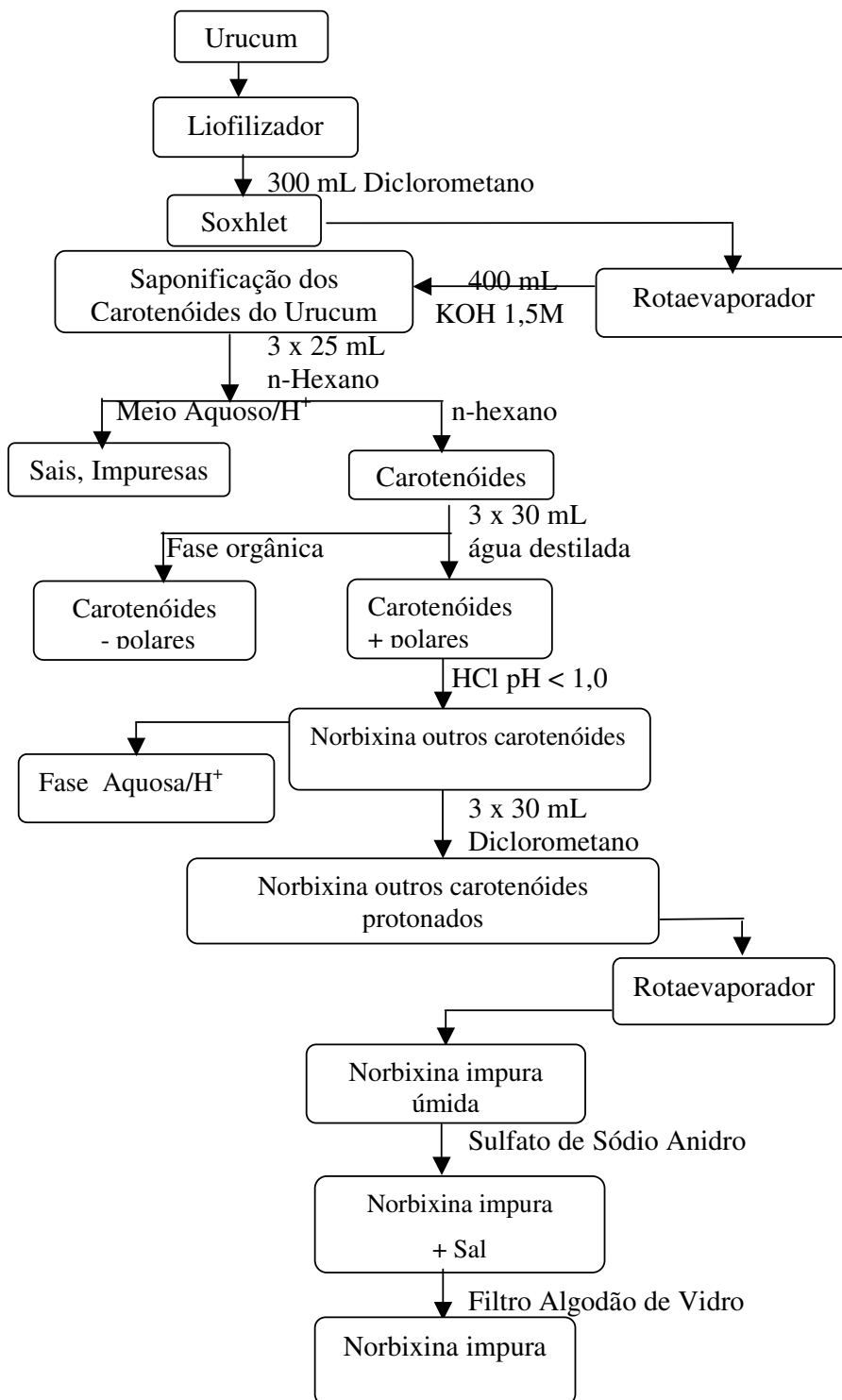


Equipament, tipo CT 60E acoplado à bomba Edwards Modelo E<sub>2</sub>M<sub>2</sub>) por 3 horas, das quais os carotenóides foram extraídos. A extração foi realizada com 300,0 mL de diclorometano em aparelho soxhlet (chapa de extração da Marca Quimis, Modelo: Q-308-26B) à uma temperatura de  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ , até completar-se 12 ciclos ou mais.

As duas frações extraídas foram combinadas e o diclorometano foi evaporado em evaporador rotativo (Fisaton, 802). Adicionou-se 400 mL de hidróxido de potássio (KOH)  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  para saponificação dos carotenóides ácidos, incluindo a bixina e norbixina. Essa mistura aquosa foi transferida para um funil de separação de 1.000 mL do qual extraiu-se os carotenóides neutros com 3 frações de 25 mL de n-hexano. O n-hexano com os pigmentos foi retornado ao funil de separação, no qual extraiu-se os sais dos carotenóides com 3 frações de 30 mL de água destilada. O extrato aquoso foi acidificado a  $\text{pH} < 1,0$  e algumas gotas de n-hexano foram adicionadas. Em seguida extraiu-se a norbixina com 3 frações de 30 mL de diclorometano. O excesso de solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Obteve-se uma pasta viscosa que foi desumidificada com sulfato de sódio anidro e filtrada em algodão de vidro e sulfato de sódio. Todo o solvente foi evaporado com nitrogênio.

A fração do extrato contendo a norbixina foi então esterificada com cloreto de acetila e álcool 1:9 à temperatura ambiente por 12 horas. Três extrações conforme descrito acima foram realizadas e cada uma esterificada na presença de um álcool diferente (metanol, etanol e n-propanol, respectivamente, a fim de obter os derivados dimetilados, dietilados e di-n-propilados), os quais são respectivamente Dimetil (9Z,)-6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato **1**, Dietil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato **2** e Di-n-propil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato **3**. O volume da solução foi reduzido a 1 mL em evaporador rotativo, transferido para um frasco menor e levado a um fluxo de nitrogênio a fim de se evaporar todo o solvente. Adicionou-se n-hexano/acetato de etila 9:1. Os derivados da norbixina extraídos foram purificados em coluna de sílica.

O fluxograma da Figura 6 mostra resumidamente a extração e separação da norbixina para posteriormente proceder a esterificação.



**Figura 6** – Fluxograma para separação dos derivados dialquilados

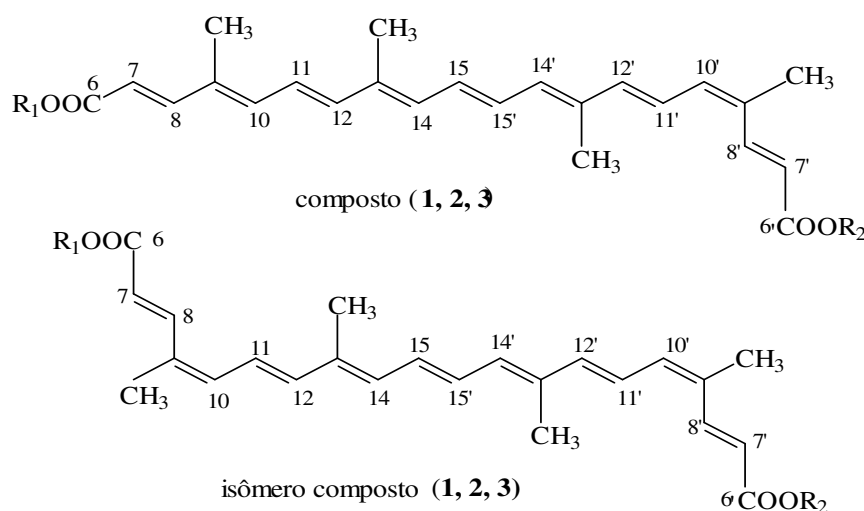
### 3.4. Purificação e Caracterização

Para purificação foram utilizadas colunas de 25 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro, preparadas com 4,0 g de sílica em n-hexano. A sílica foi mantida em estufa de secagem e esterilização Fanem modelo 315 SE. Cada derivado foi anteriormente aplicado em placa de cromatografia fina e eluidos com n-hexano/acetato de etila 9:1 (Tocchini e Mercadante, 2001) para prever a ordem de eluição dos mesmos em relação aos demais compostos presentes como impurezas. Os compostos foram identificados por UV/Visível conforme absorção,  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) apresentados na Tabela 3. A eluição dos compostos na coluna cromatográfica durante a purificação foi monitorada em UV/Visível (HP, Modelo 8452A com Detector de Diode Array), seguindo os mesmos dados da Tabela 3.

**Tabela 3** – Tabela dos derivados obtidos e seus picos de absorção (Mercadante *et al.*, 1997)

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Nome
1		Dimetil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato
2	350, 427, 453, 483	Dietil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato
3		Di-n-propil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato

A estrutura dos compostos e seu isômero *cis* estão representados na Figura 7.



**Figura 7** - Estrutura química dos compostos da Tabela 4 e seu principal isômero-*cis*. Composto **1**,  $R_1=R_2=CH_3$ ; Composto **2**,  $R_1=R_2=CH_2CH_3$ ; Composto **3**,  $R_1=R_2=CH_2CH_2CH_3$  (Mercadante *et. al.*, 1997).

### 3.4.1. Derivado Dimetilado

O derivado dimetilado da norbixina, composto **1**, foi purificado em coluna de sílica utilizando-se as frações e proporções de solvente relacionados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto **1**

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	100	F <sub>1</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	40,0	F <sub>2</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	110,0	F <sub>3</sub>
n-Hexano/EtOAc	4:1	30,0	F <sub>4</sub>

As frações coletadas foram denominadas F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e sucessivamente conforme indicado na Tabela 4.

Como a separação não foi eficaz, a fração F<sub>3</sub> foi novamente eluída em coluna de sílica com os solventes e proporções citados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto **1**

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	40	F <sub>3a</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	40	F <sub>3b</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	100	F <sub>3c</sub>

A fração F<sub>3</sub> foi aplicada em placa de sílica, eluída com n-hexano/acetato de etila 4:1, e ainda se verificou a presença de impurezas.

Outras tentativas de purificação foram testadas. Preparou-se uma placa de cromatografia fina com solução de 10% de MgO em metanol. O derivado dimetilado foi aplicado nesta placa e eluído com acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 9:1, porém não apresentou separação suficiente. Repetiu-se utilizando diferentes frações de eluição, tais como acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 4:1, acetona/hex 3:2, hex /acetona – 1:1, hex /acetona – 1:4, acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 3:1.

Tentou-se também elaborar outras fases estacionárias como sílica/MgO – 1:1, alumina 100%, sílica/alumina 1:1 e alumina/MgO 1:1, testadas com eluentes acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 4:1, Hex /acetona – 1:1, acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 3:1.

O composto sem eluição em MgO foi injetado em HPLC (Shimadzu, Série LC 10AD, Detector de diodo Array SPD – M10A vp, Forno CTO – 10A) Coluna C18, fase reversa com acetonitrila/ácido acético 65:35, 1,5 mL/min (80% ACN a 95% em 15 min.) para verificar sua pureza.

E para confirmação da estrutura os compostos foram submetidos a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN-<sup>1</sup>H), Marca: Bruker AC 200 MHz).

### 3.4.2. Derivado Dietilado

O derivado dietilado foi eluído em coluna preparada da mesma forma que para o composto dimetilado. As frações e proporções utilizadas na eluição encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6** - Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto 2

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	120	Etf <sub>1</sub>
n-Hexano/EtOAc	99:1 (1%)	20,0	Etf <sub>2</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	20,0	Etf <sub>3</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	40,0	Etf <sub>4</sub>

O composto purificado foi aplicado em placa de sílica e eluído com hexano/acetato de etila – 9:1

Foi necessária uma segunda eluição em coluna de sílica, já que na primeira a separação não foi suficientemente eficiente. A Tabela 7 apresenta os volumes e proporções utilizadas.

**Tabela 7** – Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto **2**

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	20	F <sub>1</sub>
n-Hexano/EtOAc	99:1 (1%)	120,0	F <sub>2</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	40,0	F <sub>3</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	80,0	F <sub>4</sub>

### 3.4.3. Derivado n-Propilado

O derivado n-Propilado, conforme os anteriores, foi eluído duas vezes em coluna de sílica. A Tabela 8 relaciona os volumes e proporções empregadas para a primeira eluição e a Tabela 9 para a segunda eluição.

**Tabela 8** – Volumes de solvente empregados na primeira eluição do composto **3**

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	100	F <sub>1</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	100,0	F <sub>2</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	40,0	F <sub>3</sub>

Após a primeira purificação eluiu-se o composto em placa de sílica com hexano/acetato de etila – 9:1, onde ele ainda apresentou impurezas.

**Tabela 9** – Volumes de solvente empregados na segunda eluição do composto **3**

Solvente	Proporção	Volume (mL)	Fração
n-Hexano	100%	120,0	F <sub>1</sub>
n-Hexano/EtOAc	99:1 (1%)	140,0	F <sub>2</sub>
n-Hexano/EtOAc	19:1	80,0	F <sub>3</sub>
n-Hexano/EtOAc	9:1	40,0	F <sub>4</sub>

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração inicial dos pigmentos do colorífico foi realizada em soxhlet, extração contínua, devido às vantagens de economia de solvente e maior possibilidade de proteção da amostra da luz. Como o solvente utilizado, diclorometano, permite trabalhar a temperaturas amenas, isso não comprometeria a obtenção do extrato contendo bixina e norbixina. Mesmo porque a bixina resiste a temperaturas de até 100°C (Guimarães, 1989).

A bixina difere da norbixina apenas pela substituição do grupo ácido por um grupo éster, metilado, em uma das extremidades (Figura 3). Utilizou-se o hidróxido de potássio para fazer a saponificação da norbixina e bixina, principais produtos do urucum (Tocchini e Mercadante, 2001). A saponificação da bixina e norbixina em meio básico, que é geralmente utilizada devido a sua estabilidade (Kimura, 1990; Rodriguez-Amaya, 1984), foi utilizada para converter a mesma em seus respectivos sais de potássio. Uma alternativa possível para a saponificação é a utilização da lipase, que elimina os riscos de degradação e/ou isomerização como resultado do tratamento de calor excessivo ou exposição à ambiente extremamente básico requeridos para a saponificação (Krinsky et al., 1990). Após a extração líquido-líquido, dos compostos neutros, com solvente não-polar a solução aquosa, contendo os sais de interesse, foi acidificada obtendo-se um extrato contendo somente o carotenóide diácido norbixina, pois a bixina foi convertida em norbixina.

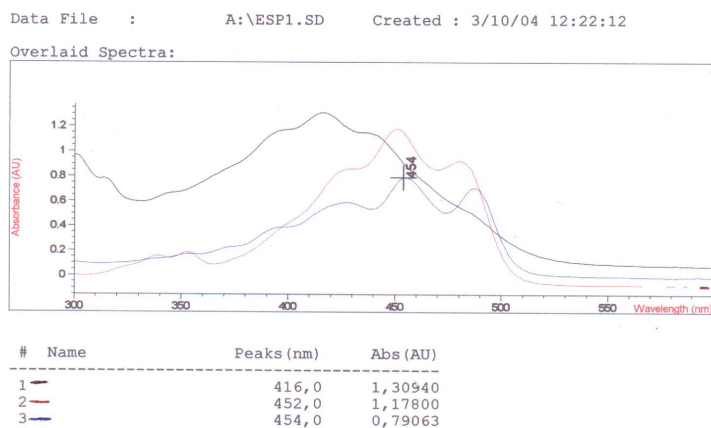
O sal da norbixina permaneceu na fase do n-hexano, e assim eliminaram-se impurezas de sais e eventuais pigmentos de maior polaridade. Para eliminar compostos de baixa polaridade, apolares, extraíu-se os carotenóides do n-hexano com água deionizada, pois em água neutra o sal da norbixina tem boa solubilidade. Esses compostos como também alguns isômeros são muito solúveis em diclorometano, (Mercadante et al., 1995) facilmente eliminado com um evaporador rotativo, o qual foi utilizado para extrair a norbixina, ainda impura da fase aquosa. Obteve-se o cuidado de retirar toda a umidade da mistura de carotenóides com a adição do sulfato de sódio anidro e posterior filtração em algodão de vidro, para eliminar a sua interferência na esterificação e para facilitar a evaporação de todo solvente (álcool). Ao término da reação, os solventes são removidos por vácuo à temperatura de 37°C (Lillington *et al.*, 1980). Obteve-se 7,6 mg de composto **1** partindo de 100 g de colorífico.

A esterificação foi efetuada utilizando-se cloreto de acetila, porque se obtém um diéster derivado da norbixina no qual o grupo metilado depende exclusivamente do

álcool utilizado como solvente para a reação. A obtenção de vários derivados, aumentando-se o grupo alquil do éster de um para dois e três carbonos teve o objetivo de obter compostos com características idênticas, porém com diferentes polaridades, e principalmente, variações nos tempos de retenção quando submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Sendo assim, possível evitar problemas com sobreposição do padrão interno com carotenóides das amostras de mexilhões.

#### 4.1. Purificação dos Derivados di-alkilados

O primeiro a ser purificado foi o derivado dimetilado, composto **1**. As frações separadas foram monitoradas pelo UV, Figura 8, e comparadas com os espectros do compostos de interesse, o Dimetil (9Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato **1**, encontrados na literatura. A leitura da primeira fração foi desprezada. Alguns carotenóides isômeros foram detectados, sendo o composto **1**, detectado na terceira fração, que corresponde a segunda leitura do espectro **1** na Figura 8. Na leitura posterior à coleta da fração 3 observa-se a variação dos picos de absorção para a direita, caracterizando outro composto, que visualmente não foi separado do anterior, sendo necessária uma segunda eluição em coluna.

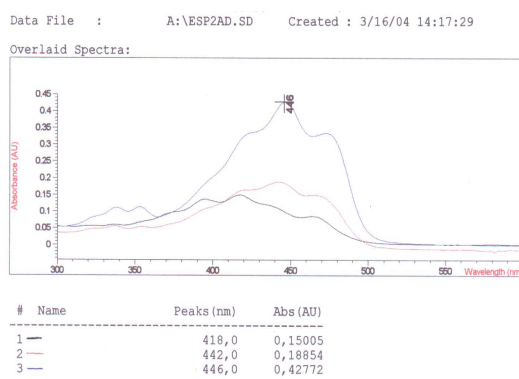


**Figura 8** – Espectro da primeira purificação em coluna do composto **1**

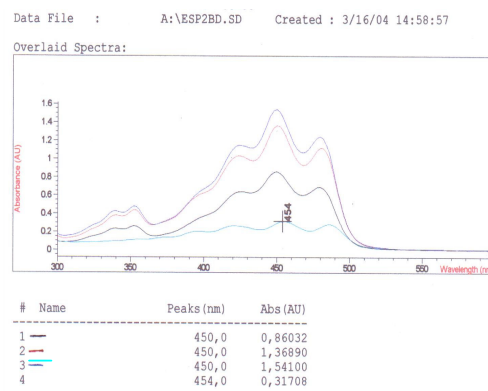
Essa fração foi novamente concentrada e purificada em coluna de sílica, na qual se observou uma melhor separação. Na Tabela 5, pode-se observar que foi necessária menor quantidade de solvente, obtendo-se uma separação mais eficiente.



As Figuras 9a e 9b são os espectros da separação da fração 3. Na Figura 9a nenhum pico característico do composto foi identificado, correspondem ao início e ao final da eluição da primeira fração (F<sub>3a</sub>) e a segunda fração respectivamente. No terceiro espectro, segunda fração, observa-se o aparecimento do pico em 350 nm, que é um dos picos característicos do composto **1**, porém os demais (442, 448 e 476 nm) correspondem ao isômero dimetil (9Z,9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato. No primeiro espectro da Figura 9b, espectro do final da fração 2, observa-se os picos em 350, 426, 450 e 480 nm, bem próximos aos apresentados na Tabela 3, caracterizando o composto **1**. Não houve separação eficiente entre esses dois isômeros pois um foi detectado no início e o outro no final da fração coletada, o que indica que o composto está coeluíndo com o anterior, e que no final da fração dois o mesmo aparece com concentração maior que no início. A partir daí, iniciou-se a coleta da terceira fração, tendo como espectro inicial dessa o próprio espectro 1 da Figura 9b. No espectro 2 da Figura 9b observa-se novamente os picos característicos do composto **1**, porém um pico discreto em 396 nm torna-se mais evidente, mostrando impureza de outro composto, que não desaparece até o final da eluição da terceira fração, conforme mostra o espectro 3. Após a coleta dessa fração, observou-se a eluição apenas do solvente e somente aumentando a polaridade do eluente o composto do espectro 4 da Figura 9b foi coletado. Observa-se que esse último espectro, 4, apresenta os picos deslocados para a direita, isto mostra que o composto é facilmente separado do composto **1**. O composto **1** foi coletado com solvente n-hexano/acetato de etila 9:1, e aplicado em placa de sílica, eluída com hexano/acetato de etila 4:1, que foi a combinação de solventes que melhor separou os compostos ainda presentes. Observou-se impurezas que eluíram mais rapidamente que o composto **1**, ou seja, o composto que saiu na fração anterior e o composto **1** coeluíram (Figura 10).



**Figura 9a** – Espectros da segunda purificação em coluna do composto **1**



**Figura 9b** – Espectro da segunda purificação em coluna do composto **1**

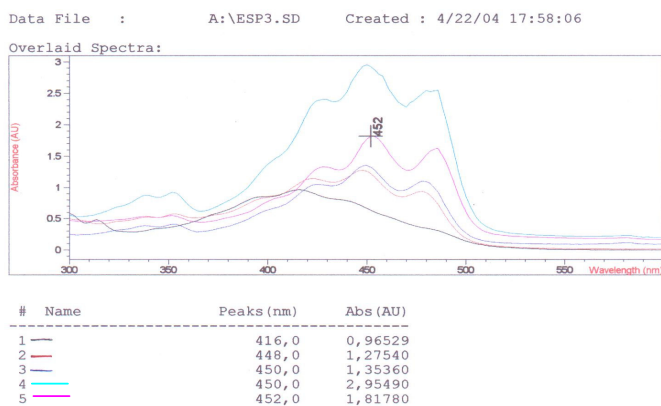


**Figura 10** – Placa de sílica eluída com hexano/acetato de etila 4:1, após a segunda purificação do composto **1**.

As várias combinações de solvente e de substrato testadas mostraram pouca eficiência na separação em coluna. Uma alternativa para aumentar a separação seria o uso do HPLC. O emprego dessa ferramenta, apesar de ainda ser de difícil acesso para alguns laboratórios de pesquisa, vem sendo utilizada na separação, purificação e quantificação dos carotenóides. Alguns exemplos foram citados na introdução deste trabalho.

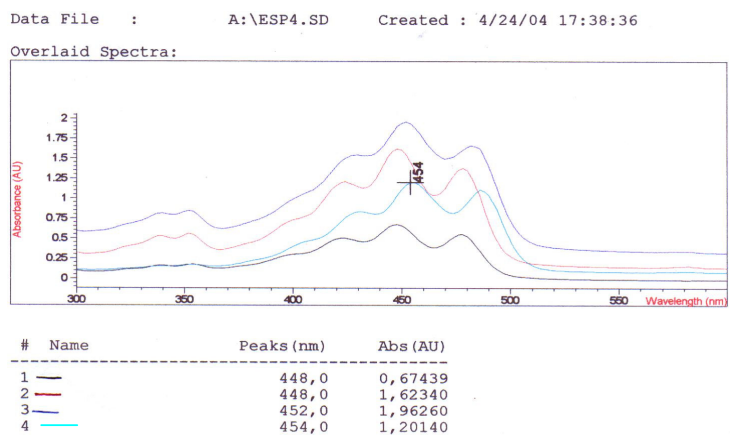
Na Figura 11, estão os espectros que representam o monitoramento da purificação do composto **2**. O espectros 1 e 2 representam respectivamente as absorções do UV/visível do início e final da segunda fração, espectro 3, terceira fração, e espectros 4 e 5 início e final da quarta fração. Os espectros da primeira fração foram desprezados.

Observa-se na Figura 11 que o espectro 3 está deslocado para a esquerda, em relação ao quarto e ao quinto espectro, que apresentaram os picos mais próximos aos do composto **2**. O espectro 4 apresenta picos em 352, 428, 452 e 482 nm, já o espectro 5 que foi obtido no final dessa fração mostra menor intensidade no pico de 350 e um pico em 486, característico de outro isômero. Assim sendo, como já se esperava a separação da eluição na primeira coluna não foi eficiente.



**Figura 11** - Espectro da primeira purificação em coluna do composto **2**

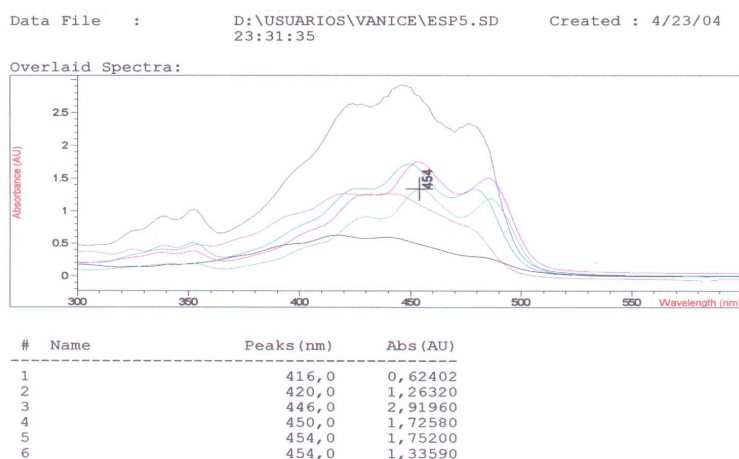
A fração 4, da eluição anterior, apresentou os espectros mostrados na Figura 12. O espectro 1, 2, 3 e 4 são respectivamente da primeira, segunda, terceira e quarta fração coletada. Os picos dos espectros 1 e 2, estão deslocados para a direita e essas duas frações foram desprezadas como impurezas. Pode-se observar que na terceira fração, espectro 3 os picos característicos do composto são identificados (352, 428, 452 e 482 nm). Na Tabela 7 observa-se que foram utilizados somente 20 mL de n-hexano 100%, o que mostra que o solvente não estava arrastando os compostos e nenhum composto foi eluído. Isto não significa que os derivados etilados dos isômeros que anteriormente eluíam antes do composto 1 não estejam mais presentes, mas que estão sendo mais retidos, pois saíram à medida que a concentração de acetato de etila foi aumentando. Pode-se pensar numa melhor interação entre o composto 2 e o acetato de etila. O primeiro composto eluiu com n-hexano/acetato de etila 1% e o composto 2 foi coletado na fração n-hexano e acetato de etila 9:1, porém comparando-se a Tabela 5 com a Tabela 7, observa-se que menos quantidade de solvente foi necessária para eluir o composto 2, o que indica uma melhor interação do solvente com o composto dietilado.



**Figura 12** - Espectro da segunda purificação em coluna do composto 2

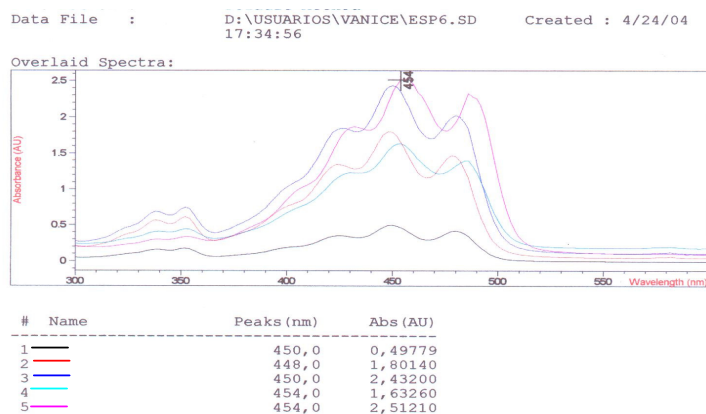
O derivado n-propilado, conforme esperado, apresentou maior interação com a coluna o que diminuiu a força do solvente. Isto pode ser observado na Tabela 9, na qual se indica a utilização de uma quantidade maior de solvente para separar os respectivos isômeros que eluem antes do composto 3. Porém a separação do composto 3 dos isômeros que eluem anteriormente foi bastante eficiente. O espectro 4 (Figura 13), que foi obtido no início da terceira fração, mostra os picos em 352, 428, 450, e 480 nm que estão bem aproximados dos valores da Tabela 4 para o composto 3. O inconveniente é que sendo

mais retido, observou-se que o composto **3** coeluiu com isômeros que eluem após, Metil (9Z) – (6')-oxo-6,5'-diapocaroten-6-oato. Observa-se isso no espectro 4 que já adquiriu as características de um dos isômero, presente como impureza.



**Figura 13** - Espectro da primeira purificação em coluna do composto **3**

Um dos espectros presentes na Figura 14 ( 398, 420, 445 nm) é um produto de degradação do composto **1**. (Mercadante, et. al., 1997).



**Figura 14** - Espectro da segunda purificação em coluna do composto **3**

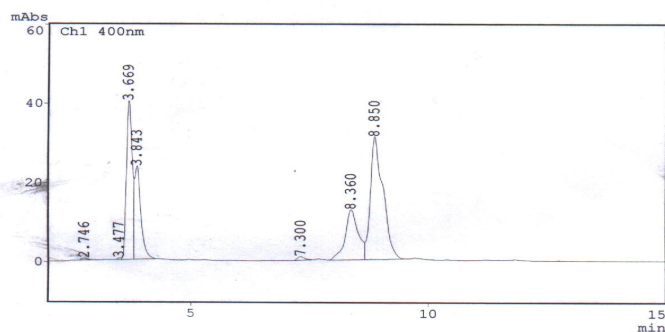
#### 4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O cromatograma da fração do composto **1** (Figura 15) apresentou 4 picos de maior intensidade, que são os compostos em maior concentração na mistura. Os respectivos espectros de UV/visível para os picos com tempo de retenção 3,669, 3,843, 8,360 e 8,850 min, estão na Figura 15a, 15b, 15c e 15d. Os espectros 15a, 15b e 15c não

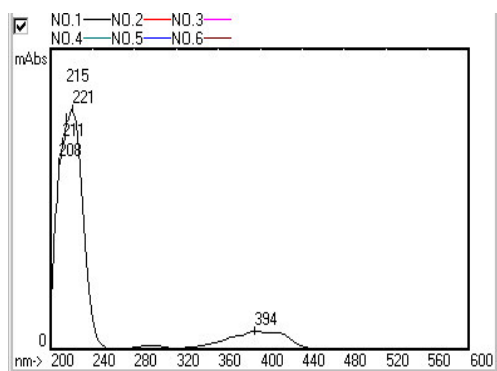
representam espectros característicos do composto 1, e nem de prováveis isômeros. Já o espectro 4 caracteriza um outro carotenóide, com cadeia menor e um grupo cetona no carbono 6'.

Supelcogel C18 4,6mmID x 25cm,  
Fluxo: 1.5 mL/min - Vol. inj. = 10 uL - Temp= 35 C  
F. Móvel: ACN/Ácidoacético(65/35)=gradiente: 80%ACN a 95%ACN em 15'.  
dimetilbixina (mtbixin).

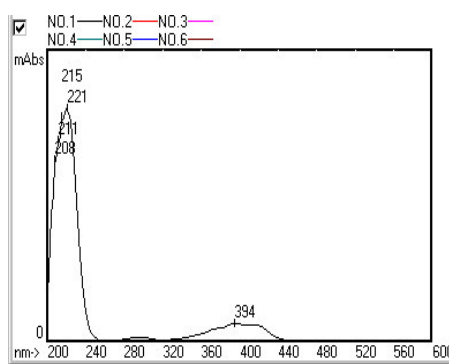
\*\*\* Chromatogram \*\*\*



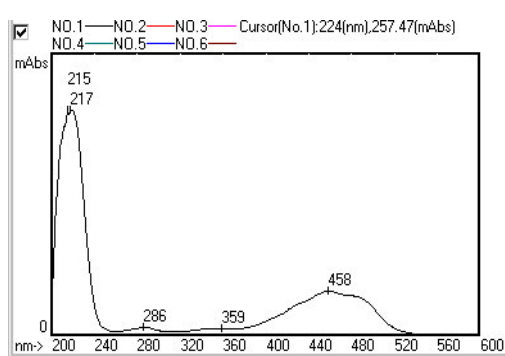
**Figura 15** – Cromatograma do composto 1



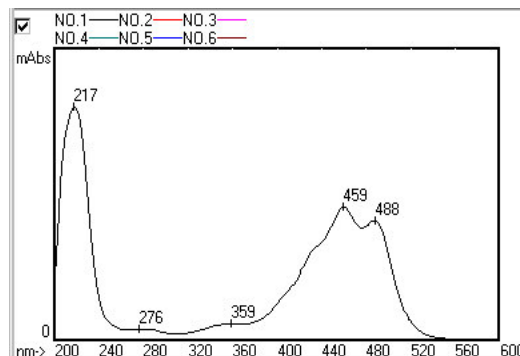
**Figura 15a** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  3,669 min



**Figura 15b** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  3,843 min

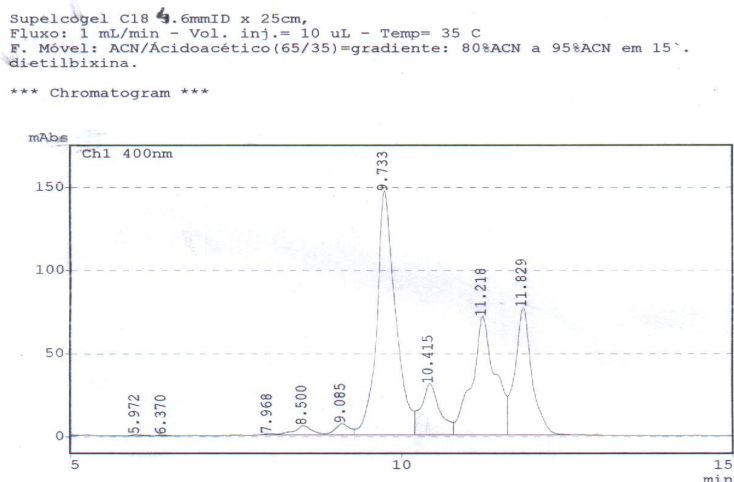


**Figura 15c** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  8,360 min

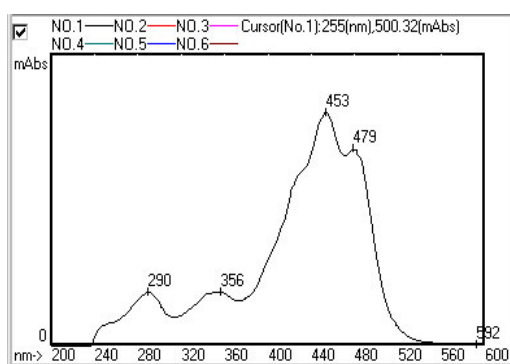


**Figura 15d** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  8,850 min

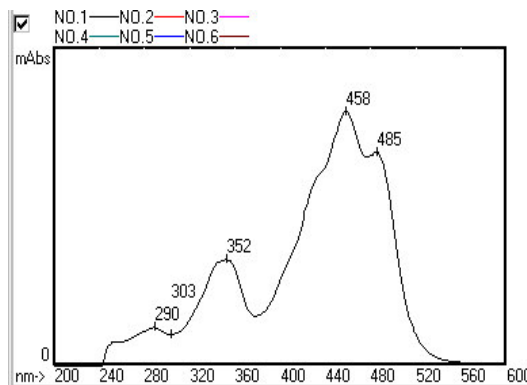
O cromatograma do composto **2** (Figura 16) apresentou 3 picos mais elevados ( $t_R$  9,7, 11,2, 11,8 min) e um intermediário ( $t_R$  10,4 min). Os respectivos cromatogramas estão nas Figuras 16a, 16b, 16c e 16d, em ordem pelo tempo de retenção. O espectro 1, que apresenta absorção em 356, 428, 453, 479 nm pode corresponder ao composto Dimetil (9Z,9'Z) – 6, 6'-diapocaroteno-6, 6' – dioato, que apresenta configuração cis nas duas extremidades. Assim o espectro 16c, absorvendo em 355, 428, 453, 479, poderia corresponder ao isômero de configuração cis somente de uma lado, que seria o composto **2**. É possível então que ele esteja se transformando no isômero de configuração cis nas duas extremidades, sendo essa a sua forma mais estável no solvente utilizado, o que explicaria o pico  $t_R = 9,733$  do cromatograma (Figura 16) ser o maior deles.



**Figura 16** – Cromatograma do composto **2**.

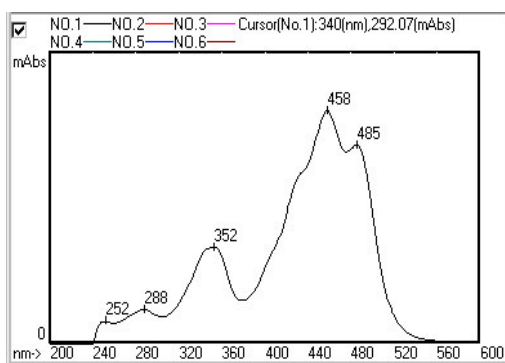


**Figura 16a** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  9,733 min

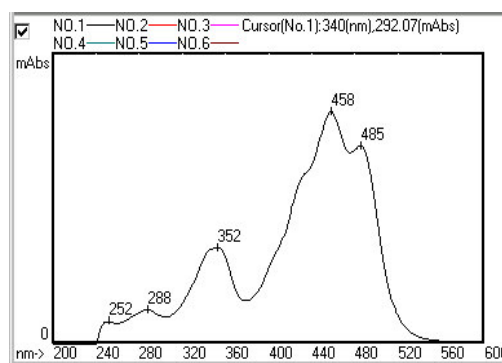


**Figura 16b** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  10,415 min

Os demais espectros, das Figuras 16b e 16d, representam outros carotenóides que possivelmente se formam a partir do composto **2**.

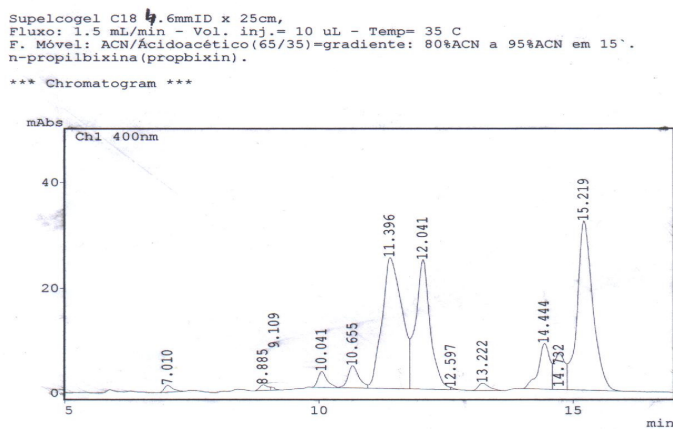


**Figura 16c** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  11,218 min

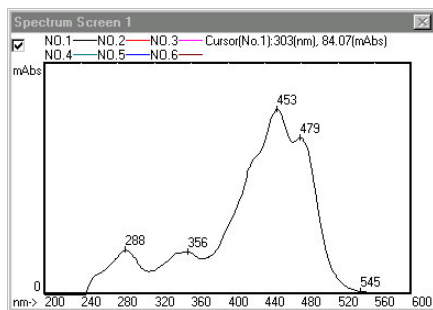


**Figura 16d** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  11,829 min

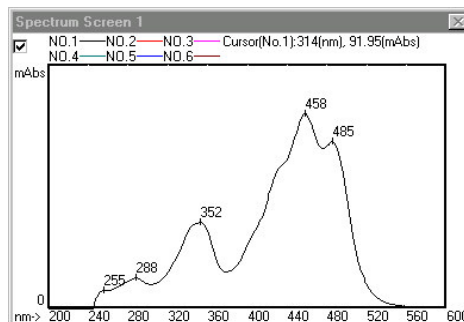
No cromatograma 3 (Figura 17) observa-se 3 picos de maior intensidade e um menor ( $t_R = 14,444$  min). Na Figura 17a, 17b, 17c e 17d estão os respectivos espectros dos picos com  $t_R$  11,39, 12,041, 14,44 e 15,21 min. Apenas o primeiro pico, Figura 17a, tem espectro semelhante aos da Tabela 3, sendo possível este ser o composto **3**.



**Figura 17** – Cromatograma do composto **3**

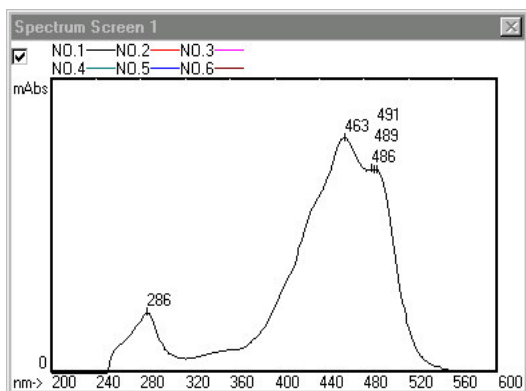


**Figura 17a** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  11,396 min

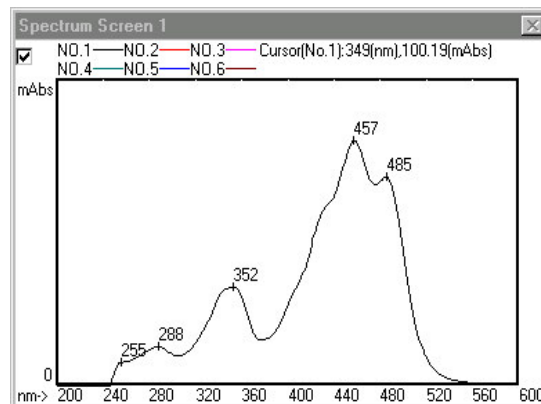


**Figura 17b** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  12,041 min

Os espectros 17b e 17d correspondem a um composto semelhante aos da Figura 16b e 16d.



**Figura 17c** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  14,444 min



**Figura 17d** – Espectro UV/visível do pico com  $t_R$  15,219 min

Como a quantidade de amostra injetada no HPLC é muito pequena e o composto não foi purificado com coluna, não foi possível identificar a estrutura do composto por RMN, devido a quantidade de impureza ainda presente.

O derivado dietilado **2** foi o que apresentou maior quantidade de composto isolado de seus isômeros na fração final. Isto pode ser observado nos valores de absorbância dos cromatogramas das Figuras 15, 16 e 17. Na Figura 16, o cromatograma do composto dietilado, o valor da absorbância do primeiro pico chega a 150mAbs e os outros dois picos maiores ( $t_R$  - 11,218, 11,829) chegam próximos a 75 mAbs. Nos cromatogramas da Figura 15 e 17 os valores de absorbância não passam de 50 mAbs. Uma das explicações para esse resultado é o fato de apresentar um tempo de retenção maior que o dimetilado, e portanto não coeluiu com o composto que saiu anteriormente como também não foi muito retido a ponto de coeluir com o composto posterior.

### 4.3. Ressonância Magnética Nuclear

A fração final do composto **2** foi analisada no RMN- $^1\text{H}$ , numa tentativa de identificar os isômeros da mistura encontrada no cromatograma da Figura 16, com a ajuda de alguns dados da literatura. Os deslocamentos de alguns prótons reportados na literatura estão relacionados aos obtidos experimentalmente na Tabela 10.



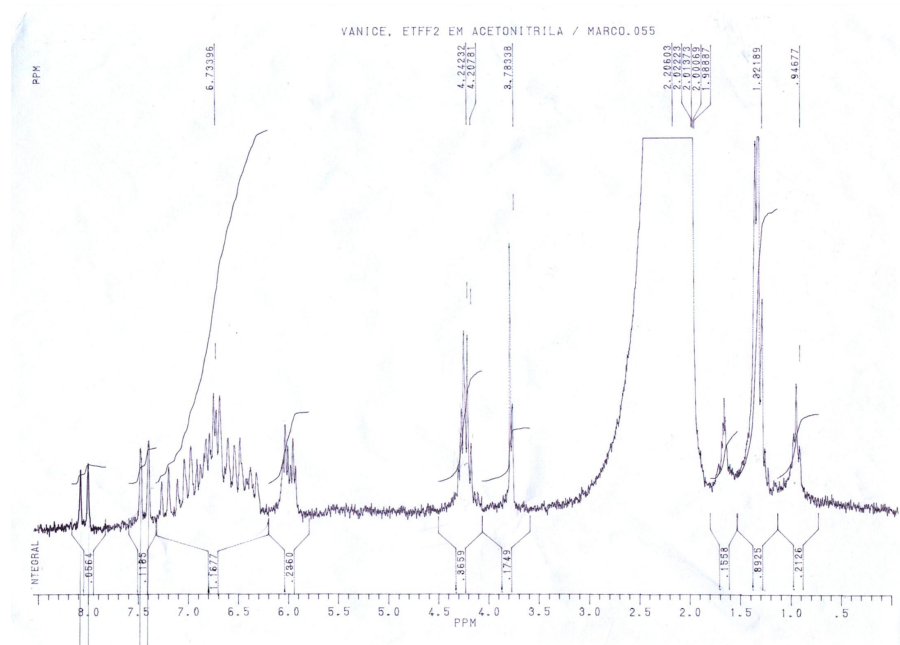
**Tabela 10** - Deslocamento de prótons (Mercadante et. al., 1997)

Tipo	ppm	H (Literatura) Composto 1	ppm	H (Literatura) Isômero Composto 1	ppm	H (Experimental)
H, s	3,76	6'-COOCH <sub>3</sub>	3,787	6-COOCH <sub>3</sub> e 6'-COOCH <sub>3</sub>	3,78	6'-COOCH <sub>3</sub>
	3,78	6-COOCH <sub>3</sub>			3,783 4,207 4,242	6-COOCH <sub>3</sub> 6'-COOCH <sub>2</sub> 6-COOCH <sub>2</sub>
H, d	5,88	H-7	5,91	H-7 e H7'	5,95	H-7, H7'
	5,91	H7'			6,05	(4d)
H, m	6,32	H-14	6,31	H-14 e H-14'		
	6,35	H-14'				
H, d	6,37	H-10'	6,37	H-10 e H-10'		
	6,50	H-10				
H, d	6,41	H-12'	6,41	H-12 e H-12'	6,3 - 7,4	H-C=
	6,52	H-12				
H, dd	6,86	H-11'	6,85	H-11 e H-11'		
	6,62	H-11				
H, d	7,96	H-8'	7,96	H-8e H8'		
	7,39	H-8				

Pelo espectro de RMN da Figura 18 pode-se perceber que as metilas ligadas à cadeia poliênica encontram-se sobrepostas pela banda do solvente em aproximadamente 2,0 ppm. No entanto observa-se bandas características de metilas alifáticas em 0,946 e 1,3218 ppm, que podem ser as metilas do éster etilado, sendo que os H do CH<sub>2</sub> aparecem em aproximadamente 4,2 ppm formando o quarteto. Em região de campo mais alto, 3,78 ppm, aparecem dois singletes que provavelmente são metilas de éster. Em região de campo mais baixo, entre 6,0 e 7,0 ppm, aparecem os hidrogênios ligados aos carbonos sp<sup>2</sup>.

Pela análise do espectro de RMN da Figura 18 tem-se indícios de que a reação ocorreu, porém como temos uma mistura de isômeros, não é possível identificar e discutir os sinais de cada suposto isômero. A mistura de isômeros mais provável são os compostos, dietilado de ambos os lados, dimetilado de ambos os lados e dimetilado em uma extremidade e dietilado na outra, ainda todos podendo adquirir forma *cis* e *trans*, mas como já se viu anteriormente o que está prevalecendo é a forma *cis*

Pode-se concluir, portanto, que a reação de esterificação ocorreu, mas não completamente, devido a saponificação incompleta. Uma alternativa seria o aumento do tempo da reação.



**Figura 18** – Espectro de RMN para o composto 2

#### 4.4. Considerações gerais

A tentativa de separação com óxido de magnésio (MgO) foi realizada em placa, porque o produto utilizado não possibilitava a operação em coluna. O óxido de magnésio disponível era de granulometria muito fina, portanto causava o entupimento da coluna. O ideal seria a aquisição de um óxido de magnésio próprio para coluna cromatográfica, para então tentar uma melhor purificação dos compostos obtidos, antes da sua injeção no HPLC.

O composto Dialquil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato mostrou não ser o mais estável, ao menos nos solventes utilizados para a sua purificação. Uma alternativa poderia ser a avaliação do seu isômero, Dialquil (9Z,9'Z)-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, a fim de isolar-se o padrão nessa forma.

O teste para avaliação dos tempos de retenção dos compostos **1**, **2** e **3** não foram possíveis, como não se obteve os compostos puros, porém pode-se observar nos cromatogramas (Figuras 15, 16 e 17) que o tempo de retenção dos principais picos está

aumentando, conforme aumenta o número de carbonos da esterificação. Os espectros das Figuras 16d e 17d são idênticos, no entanto o primeiro (derivado dietilado) sai com tempo de retenção de 11,829 min e o segundo (derivado *di-n*-propilado) com tempo de retenção de 15,219 min, e todos os picos do cromatograma da Figura 15 saem antes de 10 min.

## 5. CONCLUSÃO

O método de separação em coluna mostrou-se bastante eficiente, uma vez que se observou a separação de alguns carotenóides pelos espectros de UV/visível. No entanto, os compostos ainda presentes na mistura final do composto **2**, provavelmente são isômeros muito semelhantes, levando em conta o tempo de retenção dos mesmos e seus respectivos espectros de UV/visível.

O composto **2**, Dietil (9Z,) – 6,6'- diapocaroteno – 6,6'- dioato, foi o que apresentou maior quantidade de composto isolado de seus isômeros na fração final. Notou-se que o mesmo coeluiu menos com os compostos que eluíam antes e depois dele.

A configuração do composto que se tentou isolar pareceu não ser a mais estável nos solventes empregados para a purificação. O isômero dimetil (9Z,9'Z)-6,6'- diapocaroteno-6,6'-dioato, tem configuração cis em ambos os lados e pode ser mais estável que o composto **2**, assim sendo, o padrão poderia ser isolado nesta forma.

A reação de esterificação ocorreu, mas pode ter sido incompleta, uma vez que o espectro de RMN apresentou sinais de quartetos em aproximadamente 4,2 ppm e tripletes na região de 1,0 a 1,5 ppm, mostrando a existência da etila do grupo éster, mas também dois singletes bem definidos em 3,783 ppm, que correspondem a absorção de metilas de ésteres. Assim uma possível mistura de isômeros são os compostos, dietilado de ambos os lados, dimetilado de ambos os lados e dimetilado em uma extremidade e dietilado na outra, ainda todos podendo adquirir forma cis e trans, mas como já se viu o que está prevalecendo é a forma cis.

O teste para avaliação dos tempos de retenção dos compostos **1**, **2** e **3** não foram possíveis, mas observa-se nos cromatogramas (Figuras 15, 16 e 17) que o tempo de retenção dos principais picos está aumentando, conforme aumenta o número de carbonos da esterificação.

Alguns cuidados e recomendações adicionais podem otimizar o processo de purificação tais como trabalhar em ambiente com luz difusa, manter controle da temperatura durante a manipulação, proceder com as extrações em atmosfera de Argônio (Schiedt *et. al.*, 1995) e evitar o máximo possível o contato do composto com o ar, mantendo sempre em atmosfera de nitrogênio.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANANDRAJ, A., Marshall, D.J., Gregoru, M.A. and McClung T.P. **Comp Biochem Physiol C**, Cap 132 pp. 355-363. 2002.
- AVELAR, W.E.P., Mantellato, F.L.M., Tormazelli, A.C., Silva, D.M.L., Shuhama, T., Lopes, J.L.C. **Water, Air, Soil Pollut.** Cap 118 pp 65-72. 2000.
- BARBER, M.S., Jackman, L.M>, and Weedon B.C.L., Studies in Nuclear Magnetic Resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixin. **Jurnal of the Chemical Society**, pp 1625-1630, 1961
- BRITTON, G. Methods in plant biochemistry, Terpenoids. **Academic Press.**, v. 7 London, 1991.
- BRITTON, G., Natural Food Colorants, **Carotenoids**. 5: pp 141-182 1992.
- COSTA, S.W., Grumman, A., Neto, F.M.O., & Rockanski, M. **Tecnical Report N. 97**, Epagri, Florianópolis, 1998.
- CURTIUS, A.J., Seibert, E.L., Fiedler, H.D., Ferreira, J.F., and Vieira, P.H.F. **Química Nova**, 26 pp 44-52, 2003.
- GHIRALDINI, J.E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, pp 20-25. Campinas, 1989.
- GUIMARÃES, I. S., Urucum: Uma cor brasileira. **Ciência Hoje**, vol 9 n° 53 pp 74-75 (1989).
- KARRER, P., and Jucker J., Carotenóids. Chapter XIII (**London: Elsevier**), pp 256-271. 1950.

- KIMURA, M., Rodriguez-Amaya, D.B., Godoy, H.T., Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. **Food Chemistry**. **35**: pp187-195, 1990.
- KRINSKY, N.I., Russett M. D., Handelman, G. J., Snodderly, D. M., J. Nutr. **120**, 1654 (1990)
- LILLINGTON J. M., Trafford D.J.H. and . Makin H.L.J. A rapid and simple method for the esterification of fatty acids and steroid carboxylic acids prior to gas-liquid chromatography. **Clinica chimica Acta**, 111 pp 91-98, London, 1981
- LUNDE, K., and Zechmeister, L., Infrared Spectra and cis-trans configurations of some carotenoid pigments. **Journal of the American Chemical Society**, 77, 1647-1653. 1955.
- MARCHI, J.F., Desenvolvimento e avaliação de produtos à base de polpa e surimi produzidos a partir de tilápia nilótica, (*Oreochromis niloticus L*) **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1997.
- MCMURRY, J., **Química Orgânica**, Editora LTC, Ed 4 volume 2, pp 178 – 181. Rio de Janeiro, 1997.
- MERCADANTE, A.Z., Pfander, H. Carotenoids from annatto. A review: **Recent. Res. Devel. Agric. Food Chem.**, v. 2, pp79-91, 1998
- KRINSKY N. I., Russett M. D., Handelman G. J., and Snodderly D. M., **J. Nutr.** **120**, 1654. 1990.
- PADULA, M. Degradação de  $\beta$ -caroteno e cataxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não voláteis e voláteis. **Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas**. Campinas-SP, 1999.

- PRENTICE, C.H., Massaro, A.F., Diaz, P.S. Extration of carotenoid astaxanthin from brazilian pink shrimp (*penaeus paulensis*) processing wastes, 1998.
- PRESTON, H.D., Rickard, M.D. Estration and chemistry of annatto. **Food Chem.**, v. 2, pp 47-56. 1980.
- ROCZANSKI, M., Costa, S.W.,Boll, M.G. **Anais do XI Simposio Brasileiro de Aquicultura**, Florianópolis, Brasil, 2000.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Curso sobre pigmentos naturais. **SBCTA - FEAA/UNICAMP**. Campinas-SP, 1984.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. **Ciência de Alimentos – Avanços e perspectivas na América Latina**. Campinas: fundação Cargill, 1997. Cap 3 pp 20-31.
- SCOTT, A. I., Aplication of spectral data to investigation of gross molecular structure. Interpretation of the Ultraviolet Spectral of Natural Products, pp. 228-312. Oxford, Perganon Press, 1964.
- SCOTTER, M. J., Thorpe, S. A., Reynolds, S.L., Wilson, L.A. & Strutt P.R. Characterisation of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 11 pp 301-315, 1994
- TAKAHASHI, M., Monografia de Corantes Naturais para Fins Alimentícios. Padrões de Identidade e qualidade, pp 22-29. São Paulo, 1987.
- TOCCHINI, L., Mercadante A. Z., Extração e determinação, por CLAE, de Bixina e Norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, pp 310 – 313. Campinas, 2001.

ZECHMEISTER, L., Cis-trans isomeric carotenoid pigments. Progress in the Chemistry of Natural Products, 18, pp. 223-349, 1960.