



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

André Felipe Figueira Coelho

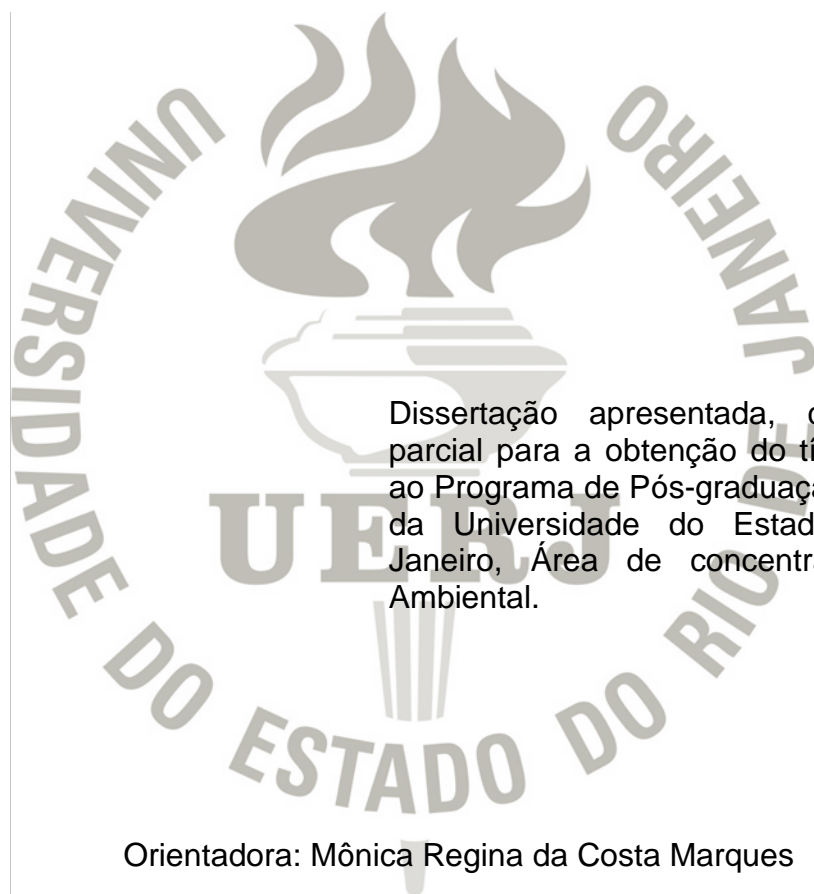
**Estudo comparativo do teor de (15E)-licopeno por CLAE-DAD entre  
lavouras de tomate submetidas aos manejos TOMATEC e tradicional**

Rio de Janeiro

2014

André Felipe Figueira Coelho

**Estudo comparativo do teor de (15E)-licopeno por CLAE-DAD entre lavouras de tomate submetidas aos manejos TOMATEC e tradicional**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Área de concentração: Química Ambiental.

Orientadora: Mônica Regina da Costa Marques

Rio de Janeiro

2014

André Felipe Figueira Coelho

**Estudo comparativo do teor de (15E)-licopeno por CLAE-DAD entre lavouras de tomate submetidas aos manejos TOMATEC e tradicional**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Área de concentração: Química Ambiental.

Aprovada em 07 de janeiro de 2014.

Orientadores:

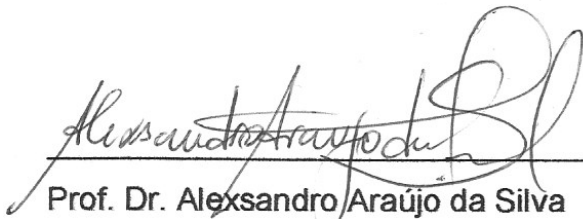
---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Mônica Regina da Costa Marques (Orientadora)  
Instituto de Química - UERJ

---

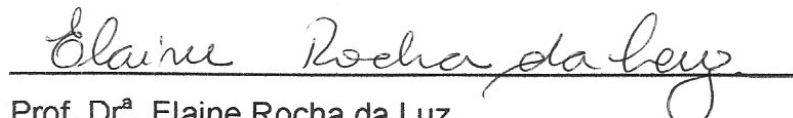
Dr. Daniel Vidal Perez  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Alexandre Araújo da Silva  
Instituto de Química - UERJ



---

Prof. Dr.<sup>a</sup>. Elaine Rocha da Luz  
Instituto Federal do Rio de Janeiro – campus Nilópolis

Rio de Janeiro

2014

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa Márcia pelo amor, companheirismo e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mônica Regina pela confiança, apoio, solidez de ideias e visão em todos os momentos do decorrer desta dissertação.

Ao coorientador Daniel Vidal Perez, pela confiança depositada e pelas trocas de ideias.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Química da UERJ, Luiz Alberto de Oliveira, pela eficiência e boa vontade nos atendimentos;

Aos diretores do IFRJ *campus* Nilópolis, Marco Aurélio Louzada, Sérgio Henrique e Sheila Pressentini pelo apoio à pesquisa;

À todos da Coordenação de Segurança de Administração de Ambientes Tecnológicos pelo apoio em todos os momentos;

À Daniele Loura, Isabela Rangel e Janaina Leite pelo companheirismo e apoio nas análises;

À manutenção do IFRJ *campus* Nilópolis por todo o suporte na montagem e manutenção dos espaços;

À Embrapa Agroindústria de alimentos pelo acolhimento e ensinamentos oferecidos, principalmente ao grupo representado por: Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Dr<sup>a</sup> Renata Galhardo Borguini, Msc. Sidney Pacheco, técnica Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento e a estudante do curso de Química Allien Monique. Obrigado pelo aprendizado e grandes trocas de conhecimento de um grupo de grande alcance em análise de carotenoides;

À FAPERJ pelo apoio financeiro junto ao projeto APQ1 2012/01.

## RESUMO

COELHO, A. F. F. *Estudo comparativo do teor de (15E)-licopeno por CLAE-DAD entre lavouras de tomate submetidas aos manejos TOMATEC e tradicional*. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é considerado um alimento funcional por sua propriedade antioxidante. O fruto contém dos carotenoides, ácido L-ascórbico, vitamina E e substâncias fenólicas. Estudos indicam que o consumo do tomate pode retardar o envelhecimento e favorecer o funcionamento do sistema imunológico em humanos, embora não seja possível afirmar uma relação direta entre a prevenção ou cura de qualquer carcinoma com o consumo de produtos à base licopeno. Na década de 1990, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) criou o projeto TOMATEC, o tomate ecologicamente cultivado. A produção é baseada em um manejo diferenciado, que objetiva a otimização do uso do solo, menor consumo de pesticidas, herbicidas e incentivo à produção familiar dos agricultores.

O estudo objetiva observar a influencia dos diferentes manejos: tradicional e TOMATEC na produção de (15E)-licopeno nos frutos do tomate, em diferentes cultivares do Brasil. Assim, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD), em fase estacionária polimérica composta de 30 carbonos (C<sub>30</sub>). Esta fase estacionária é capaz de separar carotenoides, inclusive, isômeros geométricos do licopeno. As amostras foram coletadas, tratadas, extraídas e analisadas sob as mesmas condições para avaliação das concentrações de (15E)-licopeno nos frutos.

Ensaio realizados foram capazes de demonstrar, de maneira objetiva, que a metodologia proposta conduziu a resultados confiáveis à qualidade desejada, de acordo com o guia de validação proposto pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

Foram utilizadas ferramentas estatísticas para comparar os teores de (15E)-licopeno, em diferentes Estados do Brasil, sob diferentes manejos. Os resultados indicam os maiores teores da substância em cultivares convencionais e mostram que o ensacamento do fruto é um fator decisivo para a biossíntese do (15E)-licopeno.

Palavras-chave: Licopeno. Tomate. CLAE.

## ABSTRACT

COELHO, A. F. F. *Comparative study of (15E)-lycopene content by HPLC-PDA between tomatoes cultivars under TOMATEC and traditional handling*. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is considered a functional food by antioxidant effect. The fruit contains carotenoids, L-ascorbic acid, vitamin E, and phenolic substances. Studies indicate that consumption of tomato can retard the aging effects and grow up the immune system in humans, although it is not possible to assert a direct relationship between the prevention or cure of any cancer with consumption of lycopene based products. In 1990's the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) developed the project named TOMATEC, the ecologically cultivated tomatoes. The production is based on a different management, which aims at the optimization of land use, lower consumption of pesticides, herbicides and incentives to family farmers' production.

The study aims to observe the influence of different managements: traditional TOMATEC in the production of (15E)-lycopene in tomato fruits in different Brazilian cultivars. Thus, the high performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (HPLC -DAD) in polymeric 30 carbon bonded stationary phase (C<sub>30</sub>). This stationary phase is able to separate high efficiency carotenoids, including lycopene geometrical isomers. Samples were collected, processed, extracted and analyzed under the same conditions to evaluate the (15E)-lycopene content in fruits.

Tests performed were able to show that the proposed methodology produced reliable quality results, according to the validation guide proposed by the National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO).

Statistical tools were used to compare the (15E)-lycopene contents in different Brazil States, under different managements. The results indicate the highest content of this substance in conventional cultivars and show that bagging fruit is a decisive factor for the (15E)-lycopene biosynthesis.

Keywords: Lycopene. Tomato. HPLC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 –  | A planta do tomate.....  | 20 |
| Figura 2 –  | Diferentes tipos de bagas dos frutos do tomateiro e representações das cavidades do tomate em cortes transversais..... | 22 |
| Figura 3 –  | Criação de terraços de nível no município de São José do Ubá – RJ.....   | 26 |
| Figura 4 –  | Sistemas de tutoramento em “v” invertido, em “x” e com fitilhos.....   | 27 |
| Figura 5 –  | Fertirrigação do tomateiro por gotejamento.....  | 27 |
| Figura 6 –  | Selo concedido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para produtores rurais credenciados.....       | 30 |
| Figura 7 –  | Molécula do isopreno.....  | 31 |
| Figura 8 –  | Estrutura primária dos carotenoides.....   | 32 |
| Figura 9 –  | Licopeno na forma sólida.....  | 33 |
| Figura 10 – | Estrutura do (15 <i>E</i> )-licopeno.....  | 33 |
| Figura 11 – | Estruturas do difosfato de dimetil alila e do difosfato de isopentenila.....   | 34 |
| Figura 12 – | Rota sintética pelo ácido melavolônico.....  | 35 |
| Figura 13 – | Rota sintética pelo 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose.....  | 36 |
| Figura 14 – | Síntese do difosfato de geranila.....  | 37 |
| Figura 15 – | Síntese do difosfato de geranilgeraniol a partir do difosfato de farnesila..   | 37 |
| Figura 16 – | Síntese de (15 <i>E</i> )-licopeno por meio do (15 <i>Z</i> )-fitoeno.....   | 38 |
| Figura 17 – | Licopeno comercializado pela internet.....   | 43 |
| Figura 18 – | Orbitais moleculares 4 <i>p</i> do 1,3 butadieno.....  | 44 |
| Figura 19 – | Espectros extraídos de CLAE-DAD de 3 isômeros do licopeno.....   | 45 |
| Figura 20 – | Representação de momentos dipolo no (15 <i>E</i> )-licopeno.....   | 45 |
| Figura 21 – | Separação de isômeros de licopeno em fase estacionária C <sub>18</sub> .....   | 49 |
| Figura 22 – | Separação de isômeros de licopeno em fase estacionária C <sub>30</sub> .....   | 50 |
| Figura 23 – | Cromatograma do (15 <i>E</i> )-licopeno em sistema isocrático.....   | 50 |
| Figura 24 – | Espaço para manipulação de amostras fotossensíveis.....  | 54 |
| Figura 25 – | Sistema cromatográfico .....   | 55 |



|   |    |
|---|----|
| Figura 26 – Fruto maduro do melão de São Caetano com os arilosstos.....   | 58 |
| Figura 27 – Sistema utilizado na partição melão de São Caetano.....   | 59 |
| Figura 28 – Esquema simplificado da produção da solução estoque.....  | 62 |
| Figura 29 – Esquema simplificado da manipulação das matrizes de tomate.....   | 65 |
| Figura 30 – Cromatograma da matriz concentrada do tomate.....   | 73 |
| Figura 31 – Espectros de UV-VIS para os isômeros do licopeno identificados.....   | 74 |
| Figura 32 – Cromatograma da obtenção da solução estoque de (15 <i>E</i> )-licopeno.....   | 75 |
| Figura 33 – Cromatogramas sobrepostos obtidos da diluição da solução de trabalho e para determinação do Limite de detecção..... | 81 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 – | Distribuição percentual de produção de tomate no Brasil em 2012.....            | 23 |
| Gráfico 2 – | Produção e quantidade ofertada de tomate (2000 – 2010).....                     | 24 |
| Gráfico 3 – | Exportação de tomate do Brasil (2000 – 2010).....                               | 24 |
| Gráfico 4 – | Importação de tomate para o Brasil (2000 – 2010).....                           | 25 |
| Gráfico 5 – | Curva analítica do (15 <i>E</i> )-licopeno obtido por padronização externa..... | 78 |
| Gráfico 6 – | Resíduos em função da concentração para o ajuste do modelo linear ...           | 78 |

## LISTA DE TABELAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabela 1 –  | Variantes dos formatos do tomate.....   | 21 |
| Tabela 2 –  | Países com maiores produções de tomate entre 2000 e 2011.....   | 23 |
| Tabela 3 –  | Razão Q de alguns isômeros geométricos do licopeno.....   | 46 |
| Tabela 4 –  | Comprimentos de onda e absortividades máximas.....  | 46 |
| Tabela 5 –  | Reagentes usados para a extração e partição.....  | 56 |
| Tabela 6 –  | Gradiente utilizado para análise das matrizes.....  | 60 |
| Tabela 7 –  | Tempos de retenção dos isômeros do licopeno identificados.....  | 74 |
| Tabela 8 –  | Resultado da quantificação da solução estoque.....  | 75 |
| Tabela 9 –  | Apresentação da nomenclatura da solução de trabalho em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ...  | 76 |
| Tabela 10 – | Estudo da linearidade e resultados de áreas para as soluções padrão de (15E)-licopeno e teste de Grubbs.....                              | 77 |
| Tabela 11 – | Avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos da regressão da curva analítica através do teste de Cochran (Homocedasticidade)..... | 79 |
| Tabela 12 – | Análise de variância para áreas das soluções padrão.....  | 80 |
| Tabela 13 – | Resultados do teste de repetitividade para a solução D.....   | 82 |
| Tabela 14 – | Teste de recuperação.....   | 84 |
| Tabela 15 – | Amostras analisadas provenientes do estado do Rio de Janeiro.....   | 86 |
| Tabela 16 – | Resultado de comparação entre os grupos I e II.....   | 86 |
| Tabela 17 – | Resultado da análise do teste t para os dados dos grupos I e II.....  | 86 |
| Tabela 18 – | Resultado de comparação entre os grupos III e IV.....   | 86 |
| Tabela 19 – | Resultado da análise do teste t para os dados dos grupos III e IV.....  | 87 |
| Tabela 20 – | Amostras analisadas provenientes de diferentes Estados.....   | 88 |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| 3PG             | 3-fosfato-gliceraldeído   |
| 4P2CDE          | 4-fosfato-2-C-metil-D-eritritol   |
| 5PDX            | 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose  |
| AcCoA           | Acetilcoenzima A  |
| AcOEt           | Acetato de etila  |
| ADN             | Ácido desoxirribonucleico   |
| AMV             | Ácido melavolônico  |
| ANVISA          | Agência Nacional de Vigilância Sanitária  |
| AP              | Ácido pirúvico  |
| BHBMGCoA        | $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-coenzima A   |
| C <sub>18</sub> | Fase estacionária de CLAE com cadeias de 18 átomos de carbono ligadas quimicamente a um suporte sólido              |
| C <sub>30</sub> | Fase estacionária de CLAE com cadeias de 30 átomos de carbono ligadas quimicamente a um suporte sólido              |
| CIAMB           | Programa de Doutorado em Ciências Ambientais da UFG   |
| CLAE            | Cromatografia líquida de alta eficiência  |
| CLAE-DAD        | Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos  |
| DAD             | Detector por arranjo de diodos  |
| DP              | Desvio padrão   |
| DESUSMO         | Do inglês: "Development of Sustainable Farming Systems on Mountainous, Low Fertility Grazing Land in South America" |
| DPR             | Desvio padrão relativo  |
| EM              | Espectrômetro de massas.  |
| EMATER-RJ       | Empresa de Assistência técnica e Extensão Rural do Rio de Janeiro   |
| Embrapa         | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária   |
| ENR             | Espécies nitrogenadas reativas  |

|         |   |
|---------|---|
| EOR     | Espécies oxigenadas reativas                                    |
| ER      | Erro relativo   |
| EtOAc   | Acetato de etila  |
| FAO     | Do inglês "Food and Agriculture Organization of United Nations" |
| FINEP   | Financiadora de Estudos e Projetos                              |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz   |
| FNMA    | Fundo Nacional do Meio Ambiente                                 |
| FS      | Fitoeno sintase   |
| GG      | Geranil geraniol  |
| HOMO    | Do inglês: "Highest occupied molecular orbital"                 |
| IBGE    | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                 |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia                                |
| ISO     | Do inglês: "International Organization for Standardization"     |
| LD      | Limite de detecção  |
| LQ      | Limite de quantificação   |
| LUMO    | Do inglês: "Lowest unoccupied molecular orbital"                |
| MeOH    | Metanol   |
| MSC     | Melão de São Caetano  |
| MTBE    | Metil- <i>t</i> -butil-éter                                     |
| NADPH   | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato                      |
| PADCT   | Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico   |
| PDX     | 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose                                    |
| PMSJU   | Prefeitura Municipal de São José do Ubá                         |
| PPDA    | Difosfato de dimetil alila                                      |
| PPF     | Difosfato de farnesila  |
| PPG     | Difosfato de geranila   |
| PPGG    | Difosfato de geranilgeraniol                                    |
| PIIP    | Difosfato de isopentenil  |
| PTFE    | Politetrafluoretileno   |
| RPM     | Rotações por minuto   |
| SE      | Solução estoque   |

|           |  |
|-----------|--|
| SEAAPI-RJ | Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento Pesca e Desenvolvimento do Interior do Rio de Janeiro |
| ST        | Solução de trabalho  |
| TOMATEC   | Tomate tecnologicamente cultivado  |
| TPA       | Trifosfato de adenosina  |
| TPC       | Trifosfato de citidina   |
| UERJ      | Universidade do Estado do Rio de Janeiro   |
| UV-VIS    | Faixa espectroscópica compreendida entre 200 a 800 nm  |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 17 |
| 1     | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 19 |
| 1.1   | <b>Objetivos específicos</b> .....  | 19 |
| 2.    | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 20 |
| 2.1   | <b>O tomate: Origem e taxonomia</b> .....   | 20 |
| 2.2   | <b>Consumo e produção</b> .....   | 22 |
| 2.2.1 | <u>Consumo mundial</u> .....  | 22 |
| 2.2.2 | <u>Produção e consumo de tomate no Brasil</u> .....   | 23 |
| 2.3   | <b>O tomate ecologicamente cultivado</b> .....  | 25 |
| 2.3.1 | <u>O sistema orgânico de produção agrícola</u> .....  | 29 |
| 2.4   | <b>Os Carotenoides</b> .....  | 30 |
| 2.4.1 | <u>Estrutura química dos carotenoides</u> .....   | 31 |
| 2.4.2 | <u>Classificação dos carotenoides</u> .....   | 32 |
| 2.4.3 | <u>Características físico-químicas do licopeno</u> .....  | 32 |
| 2.5   | <b>Biossíntese do licopeno</b> .....  | 34 |
| 2.5.1 | <u>As unidades isoprênicas</u> .....  | 34 |
| 2.5.2 | <u>A Rota pelo ácido melavolônico</u> .....   | 34 |
| 2.5.3 | <u>A Rota pelo 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose</u> .....   | 35 |
| 2.5.4 | <u>Síntese de carotenoides a partir do difosfato de isopentenila e do difosfato dimetilalil</u> ..... | 36 |
| 2.5.5 | <u>Síntese do Difosfato de geranyl geraniol</u> .....   | 38 |
| 2.6   | <b>Atividade antioxidante dos carotenoides</b> .....  | 38 |
| 2.7   | <b>Alimentos funcionais</b> .....   | 40 |
| 2.7.1 | <u>Histórico</u> .....  | 40 |
| 2.7.2 | <u>Os alimentos funcionais no Brasil</u> .....  | 41 |
| 2.8   | <b>Espectroscopia da região do visível em carotenoides</b> .....                                      | 43 |
| 2.8.1 | <u>Identificação dos isômeros geométricos do licopeno</u> .....                                       | 44 |
| 2.9   | <b>A análise por CLAE-DAD</b> .....   | 47 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.9.1   | <u>Análise de licopeno e seus isômeros por CLAE</u> .....                          | 48 |
| 2.9.2   | <u>Avanços na análise de licopeno e seus isômeros</u> .....                        | 51 |
| 3       | <b>METODOLOGIA</b> .....   | 53 |
| 3.1     | <b>Amostragem no plantio</b> .....   | 53 |
| 3.2     | <b>Instalações físicas, materiais e reagentes</b> .....                            | 53 |
| 3.2.1   | <u>Instalações físicas para as análises</u> .....                                  | 53 |
| 3.2.2   | <u>Equipamentos utilizados</u> .....   | 54 |
| 3.2.3   | <u>Metodologia para CLAE-DAD</u> .....   | 56 |
| 3.2.4   | <u>Reagentes utilizados</u> .....  | 56 |
| 3.3     | <b>Matrizes</b> .....  | 57 |
| 3.3.1   | <u>Manipulação das matrizes</u> .....  | 57 |
| 3.3.1.1 | Padrão cromatográfico.....   | 57 |
| 3.3.1.2 | Extração do licopeno do melão de São Caetano.....                                  | 58 |
| 3.3.1.3 | Partição da matriz de melão de São Caetano.....                                    | 59 |
| 3.3.2   | Sistema CLAE-DAD para obtenção de solução estoque.....                             | 60 |
| 3.3.3   | <u>Manipulação das amostras de tomate</u> .....                                    | 63 |
| 3.3.3.1 | Extração da matriz de tomate.....  | 63 |
| 3.3.3.2 | Partição da matriz de tomate.....  | 64 |
| 3.4     | <b>Validação</b> .....   | 66 |
| 3.4.1   | <u>Seletividade</u> .....  | 66 |
| 3.4.2   | <u>Estudo da linearidade e Faixa de trabalho</u> .....                             | 67 |
| 3.4.3   | <u>Limite de detecção</u> .....  | 68 |
| 3.4.4   | <u>Limite de quantificação</u> .....   | 68 |
| 3.4.5   | <u>Precisão</u> .....  | 69 |
| 3.4.5.1 | Repetitividade.....  | 69 |
| 3.4.6   | <u>Tendência</u> .....   | 69 |
| 3.4.7   | <u>Recuperação</u> .....   | 70 |
| 4       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 71 |
| 4.1     | <b>Obtenção do padrão de (15E)-licopeno a partir do Melão de São Caetano</b> ..... | 71 |
| 4.1.1   | <u>As metodologias de extração e partição</u> .....                                | 71 |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.1.2   | <u>Escolha do padrão de trabalho</u> .....  | 71  |
| 4.2     | <b>Validação da metodologia desenvolvida e avaliação dos critérios de desempenho</b> .....                                | 72  |
| 4.2.1   | <u>Seletividade</u> .....   | 72  |
| 4.2.2   | <u>Solução estoque</u> .....  | 74  |
| 4.2.3   | <u>Preparo da solução de trabalho</u> .....   | 75  |
| 4.2.4   | <u>Estudo da linearidade</u> .....  | 76  |
| 4.2.5   | <u>Limites de detecção e quantificação do método e faixa linear de trabalho</u> ..  | 80  |
| 4.2.6   | <u>Precisão</u> .....   | 81  |
| 4.2.6.1 | Precisão intracorrída (repetitividade) .....  | 82  |
| 4.2.7   | <u>Exatidão ou tendência</u> .....  | 83  |
| 4.2.8   | <u>Recuperação</u> .....  | 83  |
| 4.3     | <b>Determinação da concentração de (15E)-licopeno em diferentes amostras de tomate obtidas de manejos distintos</b> ..... | 84  |
| 4.3.1   | <u>Comparação entre os grupos de amostras I e II</u> .....  | 85  |
| 4.3.2   | <u>Comparação entre os grupos de amostras III e IV</u> .....  | 86  |
| 4.3.3   | <u>Comparação entre os grupos de amostras II e IV</u> .....   | 87  |
| 4.3.4   | <u>Comparação entre os grupos de amostras dos estados de Minas Gerais e de São Paulo</u> .....                            | 87  |
|         | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 89  |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 90  |
|         | <b>APÊNDICE A</b> .....   | 97  |
|         | <b>APÊNDICE B</b> .....   | 101 |

## INTRODUÇÃO

Os carotenóides fazem parte de um grupo de mais de 600 substâncias na natureza, divididos em dois subgrupos: os carotenóides hidrocarbônicos ou carotenos e os carotenóides oxigenados ou xantofilas, os quais apresentam os grupos hidroxila, metoxila e carbonila em sua estrutura.

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um alimento em plena tendência de crescimento produtivo no Brasil. A indústria alimentícia, faz uso do tomate para a preparação de molhos e conservas, além do uso em redes que comercializam alimentos prontos para consumo. Também se destaca seu uso *in natura*, comercializado em varejo. Dados estatísticos da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura mostram que a produção de tomates no Brasil cresceu de 3,0 para 4,0 Mt/ano, entre 2000 a 2010 (FAO, 2012).

O licopeno faz parte do grupo de substâncias antioxidantes presentes no tomate. Ele a vermelhidão do fruto. Existem várias formas isoméricas do licopeno, entretanto, o (15*E*)-licopeno é a forma mais abundante dentre todas. (LENUCCI et al, 2009).

Alguns grupos na comunidade científica apoiam que o consumo de tomate, principalmente *in natura*, favorece a prevenção de doenças como, por exemplo, alguns tipos particulares de câncer (WEISBURGER, 2002) e doenças cardiovasculares (WILLCOX; CATIGNANI; LAZARUS, 2003). O consumo de tomate na dieta alimentar nas formas de purê, extrato e *in natura* favorece um processo antioxidante à estrutura do DNA humano (RISO et al, 2004). Outros autores afirmam que não há relação direta entre uma dieta à base de tomate e seus derivados alimentares com doenças como cânceres de pulmão, colo retal, mama, cervical e endometrial (KAVANAUGH; TRUMBO; ELLWOOD, 2007; OMER, 2002). Da mesma forma que não existe uma relação direta entre a ingestão de licopeno (como constituinte natural do alimento, aditivo alimentar ou mesmo como suplemento dietético) e a cura de cânceres como o da próstata, gástrico, ovariano e pancreático.

Diante de um mercado interno consumidor cada vez maior e com um manejo tradicional agressivo ao solo, consumo de água e uso de agrotóxicos, instituições em

parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveram o sistema de produção do tomate ecologicamente cultivado (TOMATEC). Este sistema baseia-se em um conjunto de ações, participativas e integradas, que visam o aumento de produtividade, a aplicação de novas tecnologias associadas à instrução, ao compartilhamento de conhecimentos com o produtor familiar, à inclusão social e ao empreendedorismo. As ações agrícolas são voltadas à introdução de tecnologias menos agressivas. Destacam-se: cuidados com solo, aragem, menor quantidade de agrotóxicos, reposição correta de nutrientes, acidez, perda de água e irrigação, ensacamento das penas do fruto, entre outros. (TÔSTO et al, 2006; MACEDO et al, 2005). Análogo ao sistema TOMATEC, o sistema orgânico de produção é baseado em uma série de ações que objetivam a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos, de maneira sustentável, porém, esta prioriza a eliminação dos processos mecanizados e automatizados, assim como manipulações genéticas e apela para o uso conservativo do solo e da água, além de abolir o uso de agrotóxicos sintéticos, este modo de produção foi regulamentado no Brasil, através da lei n. 10.831 de 23 de dezembro de 2003, dispõe de maneira ampla sobre a agricultura orgânica (BRASIL, 2003).

Alguns fatores ambientais influenciam a concentração de licopeno no tomate. Dentre elas destacam-se a quantidade de herbicidas, a incidência de luz e a adição de nutrientes como o cálcio e fósforo (DUMAS, 2003).

A técnica instrumental amplamente utilizada para análise de carotenóides é a cromatografia de fase líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores na faixa de comprimento de onda do ultravioleta ao visível (UV-VIS) ou o detector com arranjo de diodos (DAD). A manipulação de amostras envolve basicamente os processos de extração e partição (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A atual literatura não exhibe qualquer estudo comparativo entre os manejos TOMATEC, tradicional e orgânico. O presente trabalho estabelece comparações estatísticas entre as concentrações de (15E)-licopeno entre lavouras submetidas aos tratamentos tradicional e TOMATEC, com a variante tratamento orgânico, de forma a verificar possíveis diferenças estatísticas entre os referidos manejos.

## 1. OBJETIVOS

A presente dissertação tem como objetivo quantificar teor de (15*E*)-licopeno, em diferentes culturas de tomate submetidas aos manejos, Tradicional e TOMATEC, por CLAE-DAD.

### 1.1 Objetivos específicos

- Isolamento e quantificação de (15*E*)-licopeno a partir da matriz de melão de São Caetano;
- Adaptação de metodologia de extração e partição para as matrizes de tomate e de melão de São Caetano;;
- Validação parcial da metodologia analítica;
- Estudo estatístico comparativo entre manejos tradicional e TOMATEC, com variantes de ensacamento, para avaliação do teor de (15*E*)-licopeno, no fruto do tomate.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O tomate: Origem e taxonomia

O “pêssego dos lobos”, assim era chamado o tomate, tradução grega do gênero *Lycopersicon*, a qual se refere o fruto do tomateiro figurava entre as lendas da América pré-colombiana como a fruta comida por lobos e lobisomens. Estudos indicam que a origem da planta do tomate tenha surgido na costa do Oceano Pacífico, entre Equador e Chile, o qual inclui as Ilhas Galápagos até elevações andinas de 2000 m de altitude (ESQUINAS-ALCAZAR; VIÑALS, 1999). Posteriormente o “xitomate”, nome de origem asteca registrado pelos viajantes botânicos, foi encontrado em elevado número de variedades na zona do México, o qual fez deste país o grande centro de seu cultivo. Os primeiros trabalhos registrados de melhoramento da planta foram na Itália, em 1560. A “poma d’oro” (maçã de ouro) revela a cor predominantemente amarela que o fruto apresentava na época. No século XVIII, o tomate era amplamente cultivado na Itália (ESPINOZA, 1991). A Figura 1 representa a planta do tomate, com seus frutos, flores e brotos.

Figura – A Planta do tomate



Fonte: ESPINOZA, 1991.

São admitidas duas sinonímias para planta do tomate. A classificação *Solanum lycopersicum* L. ganhou o primeiro nome científico por Carolus Linnaeus, em 1753, o qual atribuiu o gênero *Solanum* ao mesmo da planta da batata (*Solanum tuberosum* L.). Um ano depois, Philip Miller, classificou a planta do tomate com o gênero *Lycopersicon*. A nomenclatura de Miller (*Lycopersicon esculentum* M.) é a mais usada por botânicos.

Atualmente a comunidade científica considera uma estreita relação genética entre os cloroplastos da planta da batata e do tomate. Desta forma, parte da sociedade científica, empreendeu o resgate do gênero *Solanum* (SILVA et al, 2008). De qualquer forma serão admitidas e citadas, na presente dissertação, as duas classificações: *Solanum lycopersicum* L. e *Lycopersicon esculentum* M.

Em relação à forma do fruto, são consideradas 5 classificações para o tomate, baseado no *habitat* do plantio e nas características dos frutos. A Tabela 1 indica as variantes.

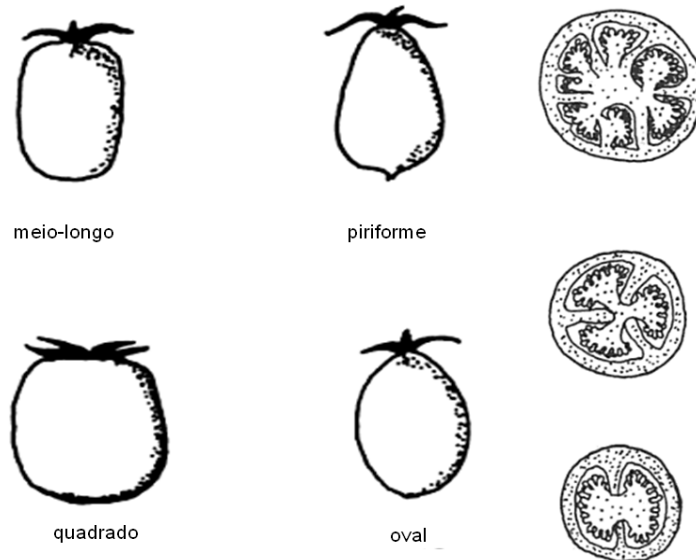
Tabela 1 – Variantes dos formatos do tomate

| <b>Variante</b>     | <b>Formato</b>                   |
|---------------------|----------------------------------|
| <i>Commune</i>      | Tomate comum                     |
| <i>Cerasiformae</i> | Frutos pequenos. Forma de cereja |
| <i>Pyriformae</i>   | Forma de pera                    |
| <i>Grandifolium</i> | Tomateiro folha de batata        |
| <i>Validum</i>      | Tomate ereto e vertical          |

Fonte: GOPALAKRISHNAN, 2007.

Os frutos possuem bagas de cor amarela, rosada, vermelha ou violácea, de forma globular, piriforme, carnosa, indeiscente, de superfície lisa ou com sulcos longitudinais. As formas são: meio-longo, piriforme, quadrado e oval. O fruto possui de 3 a 16 cm de diâmetro e o número de cavidades variam de 6 a 30, como exibido na Figura 2. O corte transversal do fruto indica a pele, a polpa que se prolonga pelo tecido placentário e a polpa gelatinosa que envolve as sementes (ESPINOZA, 1991).

Figura 2 – Diferentes tipos de bagas dos frutos do tomateiro e representações das cavidades do tomate em cortes transversais.



Fonte: ESPINOZA, 1991.

## 2.2 Consumo e produção

### 2.2.1 Consumo mundial

O tomate está entre os alimentos mais consumidos no mundo. Dados da FAO, entre os anos 2000 a 2011, relativos à produção mundial de tomate, indicam que a produção brasileira foi a 9ª maior do mundo, com 43,9 Mt. A China, maior produtor, colheu 413,6 Mt. Desta forma, o Brasil produz apenas cerca de 10% da produção do maior exportador, a China. É notável que a cultura do tomate seja representada com produções substanciais em variadas regiões do mundo como Ásia, as Américas (Norte, Central e do Sul), Europa e Oriente Médio, como exibido na Tabela 2 (FAO, 2013).

Tabela 2 – Países com maiores produções de tomate entre 2000 e 2011

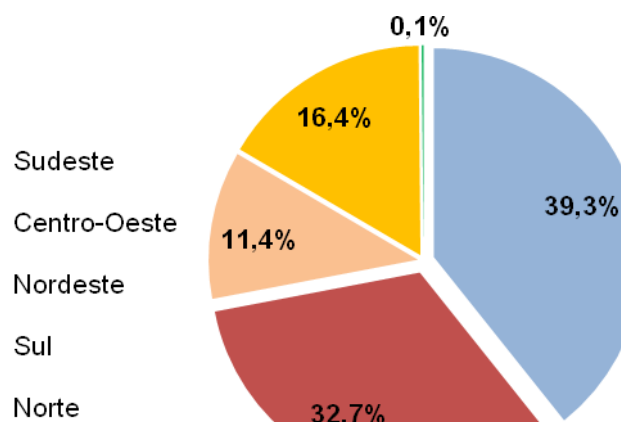
| País                      | Mt          |
|---------------------------|-------------|
| China                     | 413,6       |
| Estados Unidos da América | 153,2       |
| Turquia                   | 118,7       |
| Índia                     | 117,3       |
| Egito                     | 95,6        |
| Itália                    | 78,9        |
| República Isâmica do Iran | 56,3        |
| Espanha                   | 49,5        |
| <b>Brasil</b>             | <b>43,9</b> |
| México                    | 33,8        |

Fonte: FAO, 2013.

### 2.2.2 Produção e consumo de tomate no Brasil

Em relação à distribuição nacional da produção do ano de 2012, as maiores regiões produtoras foram a Sudeste e Centro Oeste, que compreenderam 72,0% da produção. Já as regiões Nordeste e Sul, participaram com 11,4% e 16,4%, respectivamente. A Região Norte participou com apenas 0,1% da produção total do país, conforme exibido no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição percentual de produção de tomate no Brasil em 2012

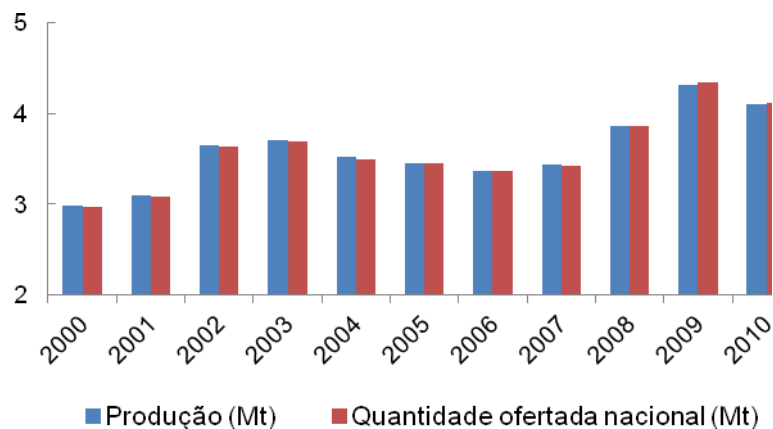


Fonte: Adaptado IBGE, 2013.



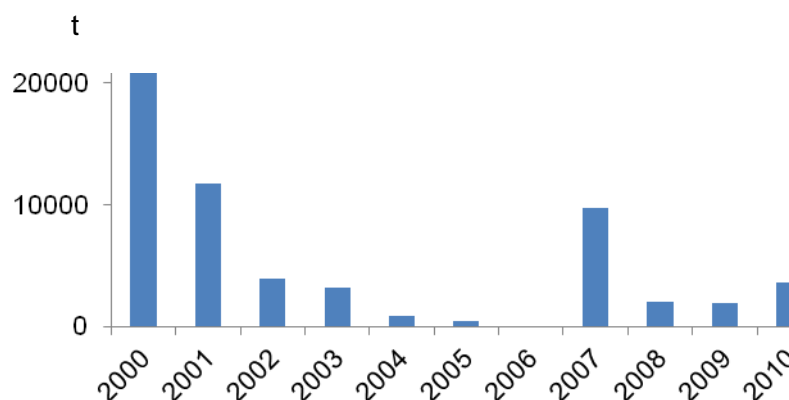
O Gráfico 2 indica que a produção brasileira de tomate, compreendida de 2000 a 2011, sofreu aumento significativo, de aproximadamente 3,0 Mt no ano de 2000 para 4,4 Mt no ano de 2011, um aumento de 46,6% para o período apurado. Também é notável o acompanhamento da produção ofertada no mercado nacional (FAO, 2013). Quanto à exportação em importação, o Brasil não realizou transações substanciais, comparado à produção do país entre os anos 2000 a 2010. O máximo exportado no período foi alcançado em 2000, com 21600 t.

Gráfico 2 – Produção e quantidade ofertada de tomate (2000 - 2010)



Fonte: FAO, 2013.

Gráfico 3 – Exportação de tomate do Brasil (2000 – 2010)

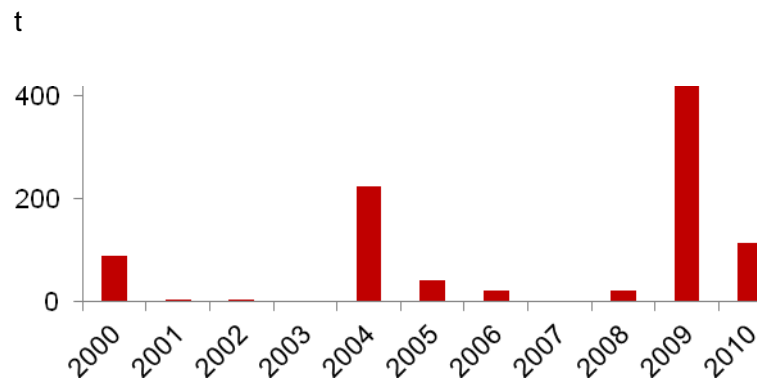


Fonte: FAO, 2013.

Em relação à importação, nunca foi revelado um comportamento regular para este tipo de transação no período. As observações acerca da importação para o

período são: A ínfima quantidade importada, com inclusive, a nulidade no ano de 2007. Outra informação notável refere-se ao ano de 2009, com 465 t de tomate importado, de acordo com o Gráfico 4.

Gráfico 4 – Importação de tomate para o Brasil (2000 - 2010)



Fonte: FAO, 2013

Os dados apresentados mostram que o Brasil possui um forte mercado consumidor interno referente ao tomate, praticamente independente de importações.

### 2.3 O tomate ecologicamente cultivado

A tomaticultura exige tratamento diferenciado, no que diz respeito à adubação e o manejo de agrotóxicos, já que não se trata de uma cultura nativa. Consequentemente, o risco de contaminação por agrotóxicos nos frutos torna-se um fator preocupante.

O Sistema de Produção do TOMATEC foi desenvolvido a partir do Projeto “Adaptação e Desenvolvimento de Tecnologias para a Gestão Agro ambiental Sustentável em Regiões de Relevo Acidentado da Serra do Mar”, da microbacia do Córrego da Cachoeira em Paty do Alferes, Estado do Rio de Janeiro, o qual foi financiado pelo projeto DESUSMO - União Européia, FINEP-PADCT / CIAMB e FNMA no ano de 1994. O mesmo foi finalizado no ano de 2006 pelo projeto “Gestão participativa da sub bacia do rio São Domingos, RJ”, financiado pelo Edital da FINEP:

02/2002, ambos coordenados pela Embrapa Solos. O sistema de produção TOMATEC contou adicionalmente com a parceria das instituições ligadas à UFRJ, UERJ, SEEAPI-RJ, Embrapa Hortaliças, FIOCRUZ, Secretaria Municipal de Agricultura e Meio Ambiente – PMSJU e EMATER-RIO, com os municípios do Estado do Rio de Janeiro: Paty do Alferes e São José de Ubá.

O sistema é estruturalmente baseado em um conjunto de ações participativas e integradas, com uso preferencial de tecnologias menos agressivas ao solo, plantas, frutos e ao próprio agricultor. As ações propostas objetivam mais que somente o aumento de produtividade, mas também, a aplicação de novas tecnologias associadas à instrução e compartilhamento de conhecimentos com o produtor familiar, que por extensão, os auxiliam na inclusão social e no empreendedorismo (MACEDO et al, 2005).

O solo é um dos maiores fatores no que diz respeito ao meio ambiente. O uso correto deste recurso assegura um solo não erodido, o que é de extrema importância para o meio ambiente e para a economia local. Dentre as ações recomendadas no sistema TOMATEC, é incluída a construção de terraços em nível com a utilização de mecanização animal, de forma a evitar a erosão hídrica e sistemas mecanizados. A figura 3 mostra um exemplo da criação de terraços de nível, no município de São José do Ubá, Estado do Rio de Janeiro (BHERING, 2007).

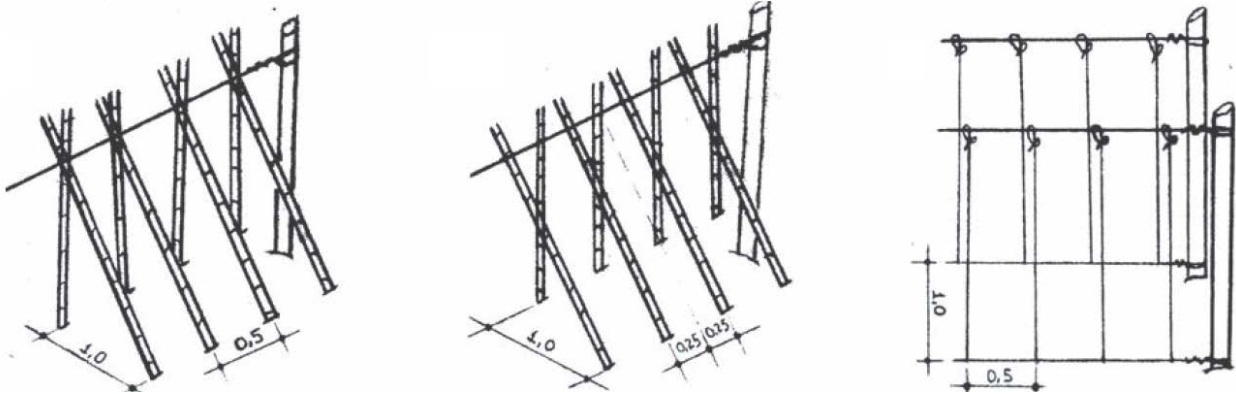
Figura 3 – Criação de terraços de nível no município de São José do Ubá - RJ



Fonte: BHERING, 2007.

A condução da planta (tutoramento) é realizado por meio de fitilhos na posição vertical, diferente do tutoramento tradicional em forma de “v”, tradicional e triangular, como exibido pela Figura 4.

Figura 4 – Sistemas de tutoramento em “v” invertido, em “x” e com fitilhos



Fonte: FERREIRA, 2012.

O tomateiro é uma planta exigente em consumo de água, seu fruto é constituído de 93 a 95% desta substância. Desta forma, a fertirrigação por gotejamento permite a economia de água, além de facilitar o transporte de adubo até a planta do tomateiro, de maneira controlada e pontual, como exibida pela Figura 5. A Irrigação abaixo do nível adequado pode comprometer a qualidade do fruto, assim como o excesso de irrigação pode causar a disseminação de doenças entre as plantas do cultivar. A adição de fertilizantes solúveis em água é muito empregada no uso desta técnica. Desta forma, uma das variantes é chamada de fertirrigação (BHERING, 2007).

Figura 5 – Fertirrigação do tomateiro por gotejamento



Fonte: BHERING, 2007.

A correção de parâmetros do solo é mais um procedimento previsto pelo sistema TOMATEC. É necessária a correção dos solos e adubação em função das análises de solos e exigências da cultura. O uso de fertilizantes é avaliado em relação às alterações nas quantidades de nitrogênio, fósforo e potássio hidrossolúveis, na aplicação de calcário ou de calagem e na reposição de micronutrientes.

E relação à mão de obra, os produtores agrícolas familiares são treinados para que tenham consciência da toxidez dos agrotóxicos manipulados, além do uso adequado dos equipamentos de proteção individual. A otimização das quantidades e da frequência de aplicação também fazem parte das instruções relativas ao TOMATEC.

Em geral, os resultados apontam aspectos positivos na adoção do TOMATEC em São José do Ubá, principalmente no que diz respeito à avaliação de impacto ambiental, à recuperação do solo e o uso mais racional da água para irrigação (TÔSTO et al, 2006).

O estudo conduzido por Ferreira et al (2012), no município de São Fidélis, localizado no Estado do Rio de Janeiro, comparou alguns aspectos entre o manejo no plantio tradicional, comparado ao manejo no plantio sob o sistema TOMATEC. Dentre os resultados do estudo, destacam-se o menor número de aplicações de agrotóxicos, menor perda da produção, menor uso de mão de obra para a operação de amarrão e desbrota, além do menor custo de produção. Verificou-se também que o manejo tradicional obteve maior produtividade, comparativamente ao sistema TOMATEC.

Em particular, o Estado do Rio de Janeiro tem reconhecido e incentivado este tipo de produção agrícola, através da Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento, através do programa Rio Rural, programa que faz parte da Secretaria de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento e tem abrigado projetos importantes como o programa, Rio Rural - Desenvolvimento rural sustentável em microbacias hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro. (FONSECA et al, 2010).

O programa Rio Rural tem abrigado projetos importantes como o programa “Desenvolvimento rural sustentável em microbacias hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro”. O objetivo do projeto busca pelo desenvolvimento da cidadania e melhoria de suas condições de vida, recuperação ambiental, aumento de renda, melhoria da infraestrutura, maior inserção no mercado e, principalmente, criação de uma nova perspectiva de vida para suas famílias e para as futuras gerações. Para tal, foi desenvolvido uma estratégia de ação que utilizam as microbacias hidrográficas do estado do Rio de Janeiro como unidade de planejamento e intervenção, com a participação direta das comunidades residentes. Atualmente, cerca de 300 mil

habitantes são beneficiários diretos do programa, das 470 microbacias identificadas. (SECRETARIA DE AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2013).

### 2.3.1 O sistema orgânico de produção agrícola

O sistema orgânico de produção cresce continuamente no Brasil. Tal efeito cobre uma demanda de consumo de mercado que busca em produtos cada vez mais seguros à saúde, livre de agrotóxicos, suplementos artificiais ao solo e manipulações genéticas da planta. Em virtude de um manejo mais trabalhoso, a agricultura familiar encontrou um potencial e crescente nicho de mercado.

O sistema orgânico agropecuário de produção é baseado em uma série de ações que objetivam a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos, de maneira sustentável. As ações também visam a manutenção da integridade cultural das comunidades rurais. O manejo, de uma forma geral, prioriza a eliminação dos processos mecanizados e automatizados, assim como manipulações genéticas, apela para o uso conservativo do solo e da água, além da abolição do uso de agrotóxicos sintéticos (MELO et al, 2012).

No Brasil, a lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003, dispõe de maneira ampla, sobre a agricultura orgânica (BRASIL, 2003), o qual seguiu por meio da regulamentação desta lei através do decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Nesta, foram delimitadas diretrizes para o regulamento técnico de produção, distribuição, rotulagem, exposição, exportação e importação e adequação das normas para produtores destinados a este fim (BRASIL, 2007).

Cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a criação de normas para boas práticas de produção de alimentos orgânicos. O MAPA, através de sua instrução normativa nº 50 de 5 de novembro de 2009, foi implementado o Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, integrado pelos órgãos e entidades da administração pública federal e pelos organismos de avaliação da

conformidade credenciados pelo MAPA. Foi também empregado o uso de um selo único, válido para todo o território nacional, como exibido na Figura 6 (BRASIL, 2009).

Figura 6 – Selo concedido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para produtores rurais credenciados



Fonte: BRASIL, 2009.

Além disso, o sítio eletrônico do MAPA disponibiliza o cadastro nacional de produtores orgânicos, acessível ao público por meio de uma planilha eletrônica, na qual os consumidores podem ter acesso a todos os produtores deste seguimento agrícola credenciados pelo MAPA. A atualização mais recente (janeiro de 2014) exhibe 2410 produtores certificados no país. (BRASIL, 2014).

## 2.4 Os Carotenoides

Os carotenoides fazem parte de um grupo específico de pigmentos naturais, o qual compreende mais de 600 substâncias conhecidas. As cores dos carotenóides compreendem o vermelho, amarelo e o laranja (ALUKO, 2012). Estão presentes em frutas e vegetais verdes, além de vagens e sementes de leguminosas como feijão e ervilha (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Em geral, localizam-se nos cloroplastos dos tecidos vegetais. Animais são incapazes de sintetizar carotenoides e a presença deles está diretamente ligada à ingestão de alimentos. (JASWIR et al, 2011).

A função dos carotenoides nas plantas está ligada intimamente à obtenção de energia luminosa para produção de energia metabólica do vegetal, assim como a

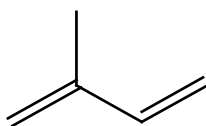
clorofila. Também funcionam como uma proteção foto-oxidativa para plantas e algas contra espécies oxigenadas tóxicas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

A composição dos carotenoides nos cloroplastos dos tecidos vegetais superiores é notavelmente constante. Seus principais componentes são:  $\beta$ -caroteno (25-30%), luteína (40-50%), violaxantina (15%) e neoxantina (15%). Outros carotenoides podem também ser detectados como:  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, anteraxantina e 5,6-epóxi-luteína. Apesar da constância de proporcionalidade, os carotenoides sofrem grande variação quantitativa nos mesmos tecidos vegetais. Grandes quantidades de carotenoides são sempre encontradas em vegetais verdes escuros (BRITTON, KHACHIK, 2009). No que diz respeito às algas, um grande número de carotenoides também são encontrados em meio marinho (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003).

#### 2.4.1 Estrutura química dos carotenoides

Há duas classificações possíveis para os carotenoides: os carotenoides hidrocarbônicos ou carotenos e os carotenoides oxigenados ou xantofilas, os quais apresentam os grupos hidroxila, metoxila e carbonila em sua estrutura. São constituídos por oito unidades isoprenicas, com indicado pela figura 7, ligados cabeça com cauda (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

Figura 7 – Molécula do isopreno

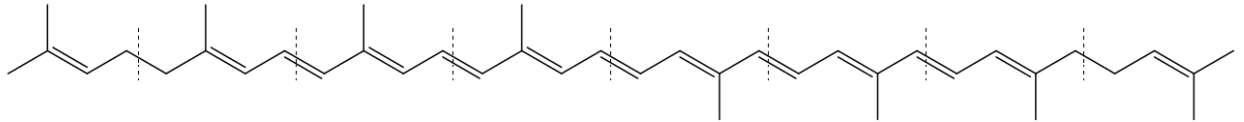


A estrutura química básica dos carotenoides é constituída de um polieno, formado pela junção de 8 unidades isoprênicas, conforme indicado pela Figura 8. A possibilidade de isomeria geométrica é comum para tais estruturas pela grande quantidade de ligações duplas na estrutura. Os radicais que podem ligar-se quimicamente à estrutura da Figura 8 são variados: Cadeias carbônicas cíclicas ou



alíclicas, saturadas ou insaturadas, com ou sem oxigênio pertencente à estrutura (INBARAJ; CHEN, 2008).

Figura 8 – Estrutura primária dos carotenoides



Fonte: INBARAJ; CHEN, 2008.

#### 2.4.2 Classificação dos carotenoides

Os carotenoides podem ser classificados de duas formas: pela estrutura molecular e pela funcionalidade. A primeira é pela estrutura molecular, a qual fornecem as denominações: carotenos ou xantofilas. Os carotenos são caracterizados por sua constituição integralmente hidrocarbônica, enquanto que as xantofilas são caracterizadas pela presença do átomo de oxigênio na estrutura.

A outra maneira de classificação dos carotenoides pode ser pela funcionalidade. Assim, denominam-se os carotenoides como primários ou secundários. Os primários são caracterizados pela participação no processo fotossintético dos vegetais, já os secundários, são assim classificados por não serem diretamente relacionados com a sobrevivência dos vegetais. O licopeno é considerado um carotenoide primário (DELGADO-VARGAS, 2003).

#### 2.4.3 Características físico-químicas do licopeno

Os carotenoides em geral, entre eles o licopeno, são substâncias de caráter lipofílico, insolúveis em água, porém, solúveis em solventes orgânicos como acetona, éter etílico, clorofórmio e acetato de etila (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A coloração vermelha do licopeno é bem visível em frutas como tomate, melancia e morango (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). A Figura 9 exhibe o licopeno na forma de pó (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2013).

Figura 9 – Licopeno na forma sólida

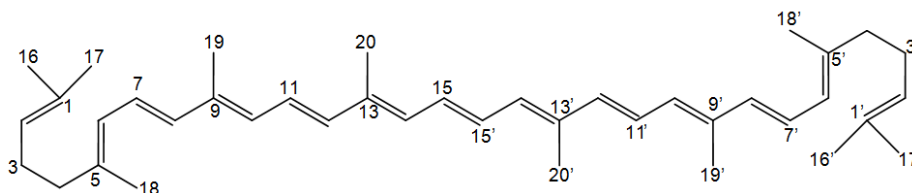


Fonte: ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2013.

Em função das 11 ligações duplas conjugadas (total de 13), o licopeno poderia apresentar 2048 isômeros geométricos em função das duplas ligações, porém, existem na natureza apenas 72 conhecidos. Os isômeros geométricos mais encontrados no tomate são os mono (*Z*) isômeros: (5*Z*)-, (9*Z*)-, (13*Z*)- e (15*Z*)-licopeno (LEE; CHEN, 2002).

A nomenclatura sistemática para o (15*Z*)-licopeno é: 2,6,10,14,19,23,27,31-octametil-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-dotriacontatridecaeno, ou,  $\Psi$ - $\Psi$ -caroteno (WINDHOLZ, 1976.), conforme indicado pela Figura 10.

Figura 10 – Estrutura do (15*E*)-licopeno



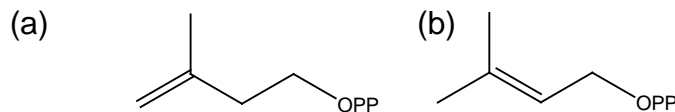
Fonte: WINDHOLZ, 1976.

## 2.5 Biossíntese do licopeno

### 2.5.1 As unidades isoprênicas

O isopreno não é diretamente a unidade formadora dos carotenoides, apesar de sua produção na natureza e proximidade com as estruturas dos carotenoides (ROHMER, 1999). As unidades isoprênicas responsáveis pela formação das moléculas dos carotenoides mais complexas são os ésteres difosfatos: difosfato de dimetil alila (PPDA), assim como o difosfato de isopentenila (PPIP), como mostrado na Figura 11.

Figura 11 – Estruturas do difosfato de dimetil alila e do difosfato de isopentenila



Legenda: (a) – PPIP; (b) - PPDA  
Fonte: ROHMER, 1999.

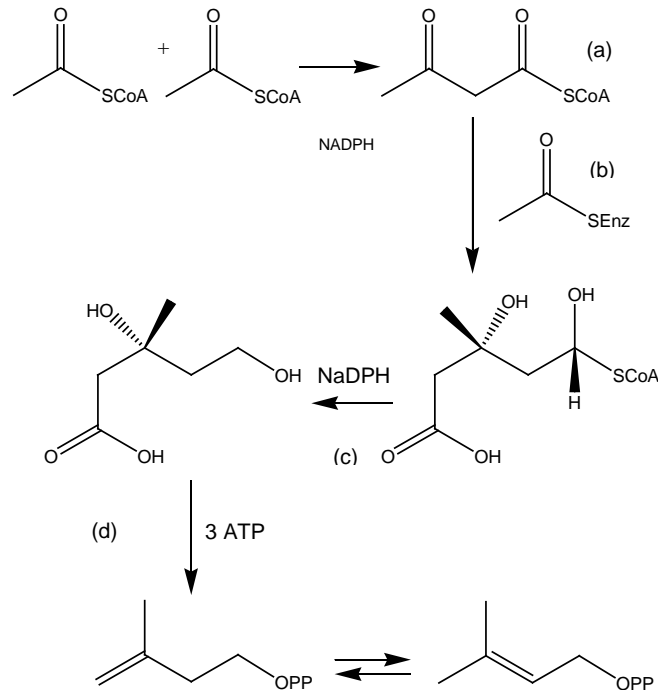
Em plantas, a síntese dos carotenoides inicia a partir do PPIP, dentro dos plastídeos e são acumulados no mesmo local. Hipoteticamente, as enzimas carotenogênicas estão associadas em complexos dentro das membranas dos plastídeos. A produção dos terpenóides através do PPIP e do PPDA é baseada em duas rotas de biosíntese: pela rota do ácido melavônico (AMV) ou pela rota do 5-fosfato 1-deoxi-D-xilulose (5PDX) (DEWICK, 2002).

### 2.5.2 Rota do ácido melavônico

A rota do AMV está envolvida na produção de carotenoides em fungos. A síntese envolve a condensação inicial de duas moléculas de acetilcoenzima A (AcCoA) para a geração de acetoacetilcoenzima, como na Figura 12a. A terceira molécula derivada da

AcCoA é incorporada e gera um aumento de cadeia, como mostra a Figura 12b, além de reduções consecutivas por NADPH, como na figura 12c, até a formação do AMV. Após uma série de etapas de fosforilações, o AMV é convertido à PPIP em equilíbrio com o PPDA, como mostrado na Figura 12d (DEWICK, 2002).

Figura 12 – Rota sintética pelo ácido melavolônico

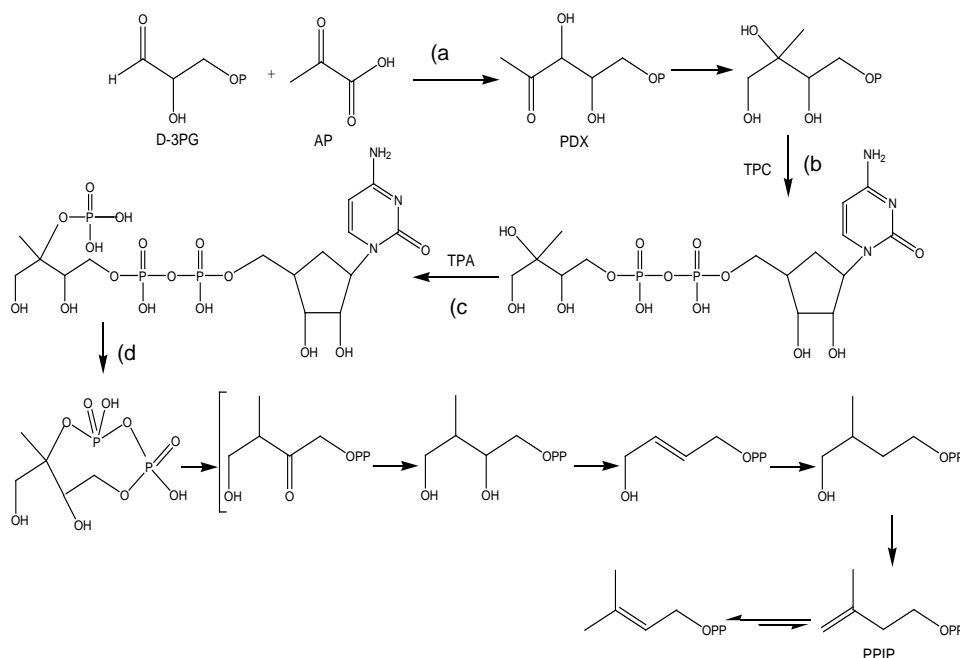


Legenda: (a) – formação de acetoacetylcoenzima A; (b) - etapa de redução de acetoacetylcoenzima A; (c) - Formação do AMV; (d) – Formação de PPIP e PPDA.  
Fonte: DEWICK, 2002.

### 2.5.3 Rota do 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose

Uma rota alternativa de formação do PPIP pode ser observada em bactérias e nos plastídios de plantas. A rota do 5PDX faz uso do padrão de síntese glicolítica, a partir do ácido pirúvico (AP) e do 3-fosfato-gliceraldeído (3PG), este que promove a descarboxilação do piruvato, Figura 13a (SANDMANN, 2000).

Figura 13 – Rota sintética pelo 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose



Legenda: (a) - descarboxilação do piruvato; (b) geração do derivado difosfocitidina; (c) – etapa de fosforilação; 9d – formação do fosfoanidrido cíclico.  
 Fonte: DEWICK, 2002; SANDMANN, 2001.

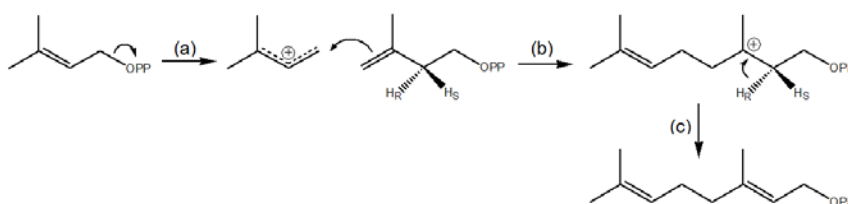
A etapa subsequente é a formação do 4-fosfato-2-C-metil-D-eritritol-4-P (4P2CDE) por meio de um rearranjo similar ao pinacólico com conseqüente redução da molécula em meio à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). O 4P2CDE reage com o trifosfato de citidina (TPC) e produz um derivado difosfocitidina, Figura 13b. este é fosforilado pelo trifosfato de adenosina (TPA), Figura 13c. O produto é convertido a uma fosfoanidrido cíclico, Figura 9d, com perda de fosfato de citidina. Este ciclofosfato leva ao produto PPIP por rotas que ainda não estão bem esclarecidas (DEWICK, 2002).

#### 2.5.4 Síntese de carotenoides a partir do difosfato de isopentenila e do difosfato dimetilalil

As propostas sintéticas para a formação dos carotenoides baseiam-se na rota de formação de unidades terpenóicas, a partir de unidades isoprênicas ativas

bioquimicamente, que são o PPIP e o PPDA. Tais unidades isoprênicas de 5 carbonos ( $C_5$ ) são as responsáveis pela formação dos terpenóides geraniol ( $C_{10}$ ), farnesol ( $C_{15}$ ), geranilgeraniol ( $C_{20}$ ). Os terpenóides esqualeno ( $C_{30}$ ) e o fitoeno ( $C_{40}$ ), embora também derivados da condensação de unidades isoprenoicas, mostram uma ligação cauda-cauda nos centros das moléculas são frutos das condensações dos terpenóides acima citados. Tanto o PPIP como o PPDA são convertidos a difosfato de geranila, por meio da enzima prenil transferase. O mecanismo reacional mais aceito é a ionização do PPDMA, Figura 14a, seguida da adição à dupla ligação do PPIP, Figura 14b, seguido da perda estereoespecífica de um próton ( $H_R$ ), como na Figura 14c.

Figura 14 – Síntese do difosfato de geranila

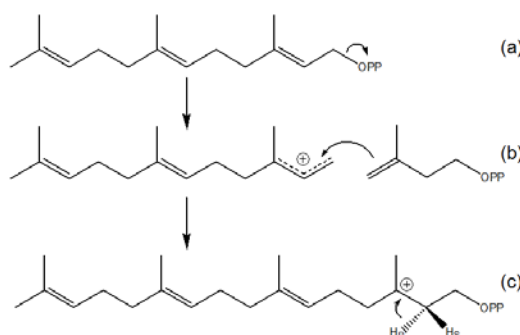


Legenda: (a) - ionização do PPDMA; (b) - Reação de adição à dupla do PPIP; (c) - Perda estereoespecífica do próton ( $H_R$ ).

Fonte: DEWICK (2002); SANDMANN (2000).

O PPG formado fornece analogamente o difosfato de farnesila (PPF), Figura 15a com a autoionização do PPG e adição à dupla ligação pelo PPIP, Figura 15b. A reação ocorre, de maneira análoga, a partir do PPF para a formação do difosfato de geranilgeraniol (PPGG), conforme indicado na Figura 15c.

Figura 15 – Síntese do difosfato de geranilgeraniol a partir do difosfato de farnesila

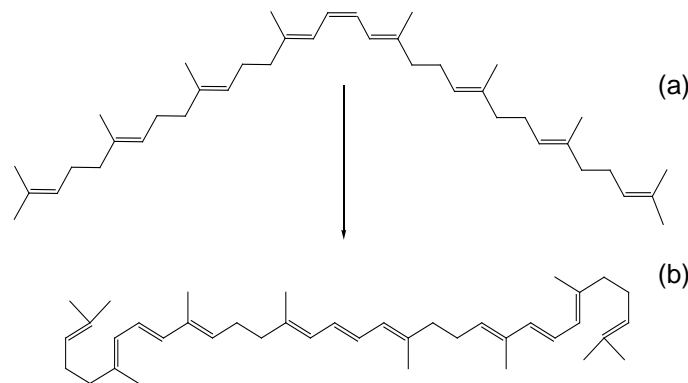


Fonte: DEWICK, 2002.

### 2.5.5 Síntese do Difosfato de geranil geraniol

Da mesma forma, como na seção 2.5.4, duas moléculas de PPGG formam o a molécula de (15*Z*)-fitoneo, Figura 16a. Com isso, Dewick (2002) afirma que uma grande sequência de reações fitoquímicas que utilizam a enzima carotenide isomerase permitem a formação do (15*E*)-licopeno, Figura 16b (TANAKA, 2007).

Figura 16 – Síntese de (15*E*)-licopeno a partir do (15*Z*)-fitoeno



Legenda: (a) (15*Z*)-fitoneo; (b) (15*E*)-licopeno  
Fonte: DEWICK, 2002.

### 2.6 Atividade antioxidante dos carotenoides

A atividade antioxidante dos carotenoides é incontestavelmente relatada por muitos autores e todos concordam que os carotenoides em geral atuam como protetores da estrutura proteica do ácido desoxirribonucleico (ADN) humano, de acordo com Delgado-Vargas (2003) e Stahl et al (2000). A presença de espécies oxigenadas reativas (EOR) e espécies nitrogenadas reativas (ENR) são comuns na participação do metabolismo humano, porém um desbalanceamento entre antioxidantes e EOR/ENR gera estresse oxidativo na estrutura do ADN, membranas de ácidos graxos de cadeia insaturada e grupos tióis em proteínas. As espécies que compõem as EOR são as

seguintes: ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), radical peroxil-lipídico ( $ROO^{\bullet}$ ) e o radical alquil-oxil ( $RO^{\bullet}$ ), os quais atuam em reações enzimáticas e não enzimáticas.

Os mecanismos genéricos que envolvem as reações entre os carotenoides, representados pela abreviatura CAR e as EOR envolvem, basicamente, três tipos: Adição radicalar (Reação 1), transferência de elétrons para o radical (Reação 2) e abstração alílica do hidrogênio (Reação 3). Também tem sido aceita a proposta para adição do radical peroxil-lipídico, adicionado em qualquer posição na cadeia do polieno carotenóico. Como esta proposta gera um produto muito estável, tal característica pode explicar o efeito antioxidante dos carotenoides em solução. Reações posteriores à formação do radical  $ROO-CAR^{\bullet}$  (Reação 4) ainda não estão esclarecidas (KRINSKY; JOHNSON, 2005).



Fonte: KRINSKY; JOHNSON, 2005.

Estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em animais demonstram um grande número de ações biológicas dos carotenoides. São elas: precursores da síntese de vitamina A, antioxidantes, aumentam a imunidade e participam da comunicação entre as células (RAO; RAO, 2007).

A revisão de Sies (1995) divulgou amplamente, através de dados de estudos em fisiologia química, a relevância de alguns grupos de substâncias com funções antioxidantes como: vitaminas C e E, além de carotenoides e como espécies oxigenadas altamente reativas podem interagir com essas substâncias.

Ainda não existe um valor de ingestão de referência para o  $\beta$ -caroteno e demais carotenoides responsáveis pela síntese da pro vitamina A. Estudos estão em andamento para ajuste de um consenso a indicação para um valor (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2000).

Riso (2004) utilizou dietas com molho de tomate, purê de tomate e o próprio fruto e analisou o estresse oxidativo do plasma sanguíneo de humanos. Resultados



indicaram uma relação direta da presença de licopeno e ácido ascórbico nas células e uma resistência oxidativa das mesmas. Estudos de Garcia-Valverde (2013) destinaram-se a análise de substâncias antioxidantes como licopeno,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e substâncias fenólicas, em tomates. Além disso, a atividade antioxidante das substâncias hidrofílicas em diferentes variedades de tomates, estágios de maturação e processamento e verificou que o ponto máximo de maturação revela maior potencial antioxidante do tomate, além de maior teor de (15E)-licopeno. Os produtos *in natura* possuíram um teor ligeiramente menor desta substância frente ao produto processado, o que é compreensível, pois este último está na forma de purê, com menor teor de água.

Dumas (2003) analisou uma vasta quantidade de publicações, as quais analisaram as variações de concentração de antioxidantes em função fatores ambientais em culturas tomateiras. Fatores como irrigação deficiente e exposição exagerada a luz relacionam-se com a diminuição da concentração de licopeno no fruto, entretanto, o autor relata que ainda são poucos os dados para que sejam obtidos condições ótimas de crescimento da planta do tomate para que os antioxidantes tenham concentrações máximas no fruto.

## **2.7 Alimentos funcionais**

### **2.7.1 Histórico**

De acordo com Wildman (2000), alimento funcional é um alimento natural ou formulado o qual melhora o desempenho fisiológico, prevenir ou tratar doenças ou distúrbios. Eles incluem os itens desenvolvidos para fins de saúde, assim como para performance física. Dentre os alimentos funcionais mais conhecidos, estão os vegetais com as colorações amarelo, verde escuro e vermelho, como o tomate.

O conceito do termo alimento funcional, ou alimento fisiologicamente funcional, foi criado no Japão, em 1984, através do incentivo para pesquisa e desenvolvimento de alimentos funcionais, criado pelo ministério da educação ciência e cultura japonês. O projeto foi originado para o triênio 1984-1987, mas depois foi estendido por mais dois triênios, 1988-1991 e 1992-1995. O custo total do programa foi próximo de US\$ 9 milhões. O resultado foi um relatório criado pelo Comitê de Estudos para Alimentos Funcionais, em 1990, resultou um decreto chamado: *Foods for specific health use* (alimentos para uso específico da saúde), implementado pelo governo nipônico em setembro de 1991. (FARR, 1997).

### 2.7.2 Os Alimentos funcionais no Brasil

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) introduziu o termo “propriedade funcional” pela primeira vez, por meio de sua Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999a). O principal enfoque trata do Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos. Por meio dele, a ANVISA buscou um aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, aplicados principalmente para os alimentos ou substâncias que não tinham histórico de consumo no país, ou ainda alimentos com substâncias já consumidas, mas adicionadas ou utilizadas em altos níveis aos observados nos alimentos utilizados na dieta regular.

Desta forma, a indústria alimentícia passou a providenciar um relatório técnico científico de avaliação de risco e demonstração de segurança, avaliado por uma Comissão de Assessoramento Técnico científica em Alimentos Funcionais e novos Alimentos, instituída pela ANVISA. Já a Resolução da ANVISA n. 17, de 30 de abril de 1999, aprovou o Regulamento Técnico para estabelecimento das Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança de Alimentos com o intuito de provar, baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro do que diz respeito à saúde. (BRASIL, 1999b);

No anexo da Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, consta com as alegações de propriedades funcionais ou de saúde de alimentos para consumo humano,

veiculadas nos rótulos de produtos elaborados, embalados e comercializados prontos para a oferta ao consumidor. Deve-se ressaltar que a seção 3.3 da referida resolução refere-se ao produto final, e não a ingredientes ou componentes dos alimentos.

A ANVISA define a propriedade funcional como relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999c). A mesma resolução ainda identifica os testes necessários à aprovação junto à ANVISA:

COMPROVAÇÃO DA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS OU DE SAÚDE.

4.1. A comprovação da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde de alimentos e ou de ingredientes, deve ser conduzida com base em: consumo previsto ou recomendado pelo fabricante; finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso; evidência(s) científica(s) descrita(s) no item 4.2..

4.2. Evidências científicas aplicáveis, conforme o caso, à comprovação da alegação de propriedade funcional e ou de saúde: composição química com caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto; comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (BRASIL, 1999c).

A Resolução da ANVISA RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002 passou a classificar grupos de substâncias químicas como substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, dentre elas, os carotenoides.

Desta forma, a comercialização do licopeno, como substância bioativa foi liberada para comercialização, desde que atendam ao disposto no Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos, da própria ANVISA.

Produtos à base de licopeno extraído do tomate são comercializados livremente. Alguns suplementos podem ser observados na Figura 17, descaracterizados em relação ao nome do fabricante (BRASIL, 2002).

Figura 17 – Licopeno comercializados pela internet



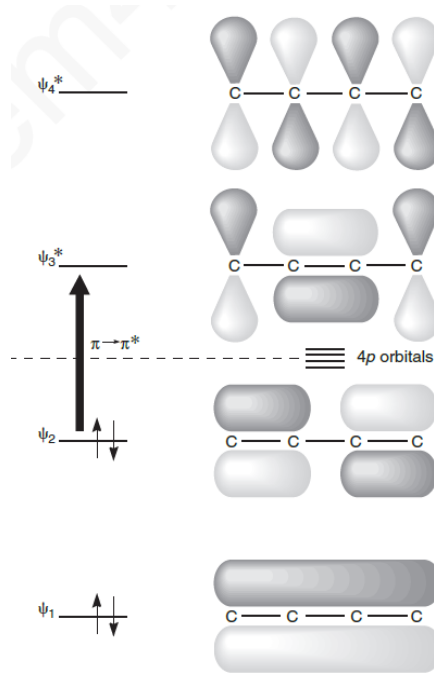
## 2.8 Espectroscopia da região do visível em carotenoides

A cor vermelha típica do licopeno é baseada no fenômeno espectroscópico de absorção de luz na região do visível do espectro, que compreende entre 450 a 750 nm.

O fenômeno de absorção da radiação eletromagnética na região do visível do espectro sobre a matéria pode conduzir a uma mudança dos elétrons não ligantes ou elétrons pi ( $\pi$ ) de um estado energético de menor nível para outro maior. Este processo de excitação é quantizado e trata-se de uma transição energética exclusivamente eletrônica. Em termos de teoria do orbital molecular, o elétron é promovido de um orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) para um orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (LUMO). A diferença de energia normalmente varia entre 125  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  e 650  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (PAVIA et al, 2008). Para polienos, a transição observada é de elétrons  $\pi$  para elétrons antiligantes  $\pi^*$  para moléculas similares ao licopeno e seus isômeros geométricos. Desta forma, orbitais atômicos  $p$  ( $\phi$ ) dos carbonos dos sistemas conjugados em polienos, como o licopeno, interagem para produzir orbitais moleculares ligantes e antiligantes (representados pelas funções de onda  $\psi$  e  $\psi^*$ ), por combinações lineares. O orbital ligante é o resultado da soma das funções de onda de dois orbitais  $p$  e o orbital antiligante ( $\psi^*$ ) é o resultado da subtração das funções de onda dos mesmos orbitais  $p$ . Para sistemas de polienos como os carotenoides, especialmente o licopeno, as transições observadas  $\pi \rightarrow \pi^*$  (HARVEY, 1999). A figura 18 exhibe, como exemplo, as possibilidades de interações entre orbitais moleculares  $4p$  da molécula do 1,3-butadieno. Para moléculas como a do licopeno, o conjunto de ligações duplas

conjugadas fornecem interações de maior complexidade entre os orbitais (PAVIA et al, 2008).

Figura 18 – Orbitais moleculares 4p do 1,3 butadieno

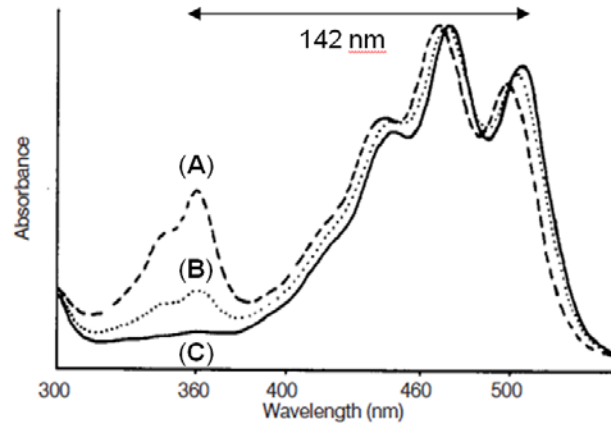


Fonte: PAVIA et al, 2008

### 2.8.1 Identificação dos isômeros geométricos do licopeno

Os carotenoides em geral possuem um padrão espectral na região do visível. Em geral, são representados por 3 picos intensos, ou ainda, 3 picos intensos e mais uma pico chamado de pico Z ou pico *cis*. (SALEH; TAN, 1991). O pico (Z) surge a aproximadamente 142 nm abaixo da banda de maior absorção do carotenoide, como observado na Figura 19 (ZECHMEISTER et al, 1943). Existem mais efeitos espectrais notáveis entre para os isômeros Z, comparado ao 15(E)-licopeno, como os efeitos hipsocrômico e hipocrômico.

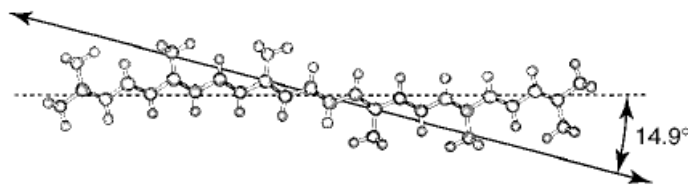
Figura 19 – Espectros extraídos de CLAE-DAD de 3 isômeros do licopeno



Legenda: (A) (15Z)-licopeno, (B) (13Z)-licopeno e (C) (15E)-licopeno.  
 Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

Com relação ao aparecimento do pico (Z) ou cis em carotenóides, estudos iniciais realizados por Zechmeister et al (1943) afirmavam haver um relação direta entre o aparecimento do pico *cis* ou Z em moléculas de carotenoides com a forma curva que os mesmos adquirem nesta configuração geométrica por associação ao momento dipolo da mesma por sua assimetria. Desta forma, uma nova transição eletrônica é intensificada. Já Murrel (1963), afirma que o pico *cis* não é significativo para o 15(E)-licopeno em função dos momentos de transição simetricamente equivalentes, o que impede a formação de um dipolo na molécula, e assim, entende-se tal efeito como uma transição proibida. Birge et al (1999) calculou os momentos dipolo do 15(E)-licopeno computacionalmente, como representado na Figura 20.

Figura 20 – Representação de momentos dipolo no (15E)-licopeno



Fonte: BIRGE et al (1999).

Aditivamente, a razão Q é uma das formas de auxílio na identificação espectroscópica. Ela é calculada pela razão entre as alturas da banda Z pela altura da

banda de maior absorção do carotenoide. A tabela 3 indica os valores da razão Q de alguns isômeros do licopeno.

Tabela 3 – Razão Q de alguns isômeros geométricos do licopeno

| Substância     | Razão Q           |
|----------------|-------------------|
| (15Z)-licopeno | 0,75 <sup>a</sup> |
| (13Z)-licopeno | 0,56 <sup>a</sup> |
| (9Z)-licopeno  | 0,13 <sup>a</sup> |
| (5Z)-licopeno  | 0,07 <sup>b</sup> |

Fonte: a - YEUM et al, 1996; b - SCHIERLE et al, 1997.

Para os isômeros geométricos do licopeno, a identificação é essencialmente realizada por meio de varredura espectroscópica na região que compreende a faixa de comprimento de 600 a 300 nm, aproximadamente.

Desta forma, além do formato espectral característico dos isômeros do licopeno, como descrito exibido pela figura 19, os comprimentos de onda com absorções máximas dos isômero (15E)-licopeno são tabelados pela literatura e variam conforme o solvente utilizado. A espectrofotometria UV-VIS é a técnica usada para a quantificação do (15E)-licopeno, como mostra a tabela 4.

Tabela 4 – Comprimentos de onda e absorvidades máximas

| Substância     | Solvente         | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) |     |     |
|----------------|------------------|-----------------------------|-----|-----|
| (15E)-licopeno | Propanona        | 448                         | 474 | 505 |
|                | Clorofórmio      | 458                         | 484 | 518 |
|                | Etanol           | 446                         | 472 | 503 |
|                | Éter de petróleo | 444                         | 470 | 502 |

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

Não existem substâncias de referência comercializáveis para os isômeros geométricos do licopeno, com exceção do (15Z)-licopeno, portanto, em CLAE-DAD, a identificação destes é realizada apenas por meio do exame das relações entre as alturas das bandas do espectro extraído, em função do tempo de retenção das substâncias detectadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Esta forma de identificação pode ser observada em uma série de artigos. Shierle et al, 1997, utilizou esta característica espectroscópica no licopeno para analisar os seus isômeros geométricos em plasma humano, enquanto que, Lee e Chen (2001)

criaram um estudo comparativo para observar o desempenho entre as separações de isômeros de licopeno que utilizaram diferentes fases estacionárias C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub>.

## 2.9 A análise por CLAE-DAD

A cromatografia é considerada um método de separação, o qual os constituintes da amostra são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel, durante o processo chamado eluição. Em geral, a fase estacionária é sólida ou líquida e a fase móvel pode ser líquida ou gasosa. Quando a fase móvel é um líquido, o tipo de cromatografia é a cromatografia líquida ou com fase líquida. A CLAE é caracterizada pelo emprego de pressões elevadas durante a separação cromatográfica, diferentemente da cromatografia líquida clássica que opera à pressão ambiente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). As principais vantagens da técnica são: determinações quantitativas com boa seletividade e separação de espécies não voláteis e termicamente estáveis (TONHI et al, 2002).

Atualmente, o detector de arranjo de diodos é o mais largamente empregado na CLAE, pois é bastante sensível, adequado para eluições em gradientes e não sofre alterações por flutuações de temperatura (MEYER, 2004). Os detectores DAD realizam varreduras espectrais em faixas de comprimento de onda e suas respostas medem as variações na absorbância da luz na região de 190 nm a 800 nm durante a passagem do eluente da coluna cromatográfica na célula de fluxo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Fases estacionárias cada vez mais seletivas são fabricadas para a separação de substâncias com estruturas muito próximas, inclusive para isômeros geométricos provenientes de carotenoides.



### 2.9.1 Análise de licopeno e seus isômeros por CLAE

O tomate possui em sua composição majoritária o isômero (15*E*)-licopeno (94 a 96%). Mas outros isômeros também estão presentes, como o (5*Z*)-licopeno (3 a 5%), o (13*Z*)-licopeno (1%) e (9*Z*)-licopeno (0 a 1%) (SCHIERLE, 1997).

A CLAE é a técnica analítica mais adequada para a análise dos isômeros do licopeno, assim como os carotenoides em geral. A aplicação dos detectores podem variar, como o DAD, o UV-VIS, detector de massas, e ainda, o sistema de CLAE acoplado com o equipamento de ressonância magnética nuclear. A técnica de CLAE não é destrutiva para substâncias facilmente degradáveis, como o licopeno e seus isômeros geométricos. A CLAE de fase reversa é amplamente utilizada. Tradicionalmente, fases estacionárias com suportes de sílica ligada a radicais polimerizados alquila de 18 átomos de carbono (C<sub>18</sub>) eram e ainda são usadas na separação de carotenoides e, atualmente, fases estacionárias com suportes de sílica polimérica ligada a radicais polimerizados alquila de 30 átomos de carbono (C<sub>30</sub>).

O licopeno normalmente é analisado *in natura* no tomate ou em formas processadas do mesmo como: molhos de tomate, sucos e tomate em pó. Inicialmente, o licopeno era separado dos demais carotenoides através de análises na CLAE com dois tipos de detectores: DAD e UV-VIS (BRITTON; KHACHIK, 2009).

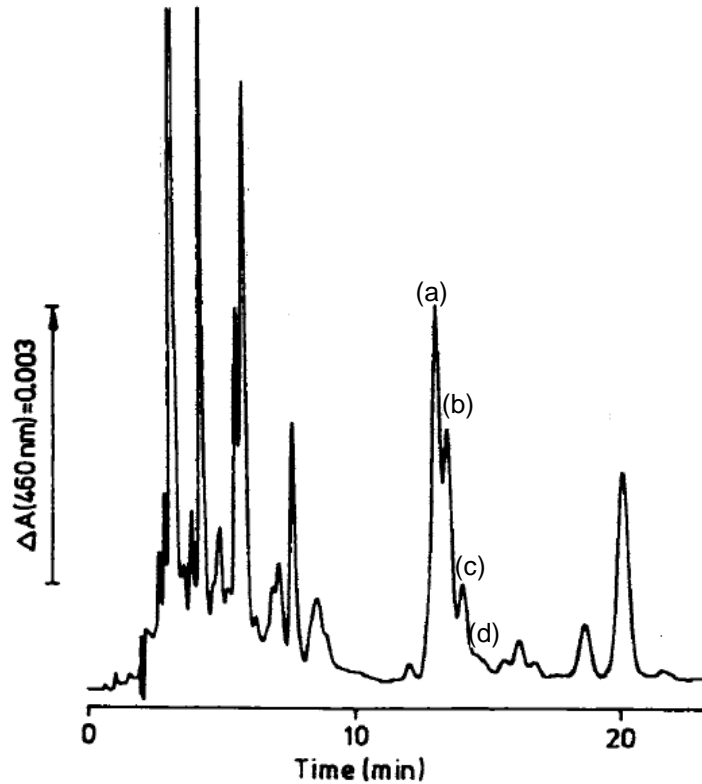
Análises de licopeno e seus isômeros foram realizados em CLAE-UV de fase normal, o qual se utilizava como fase estacionária a sílica gel (STAHL, 1993). Análises em CLAE que utilizaram fase reversa em carotenoides como C<sub>18</sub> foram inseridas na década de 1970 (ZACARIA et al, 1979) sinalizaram o a evolução da fase normal para a fase reversa e o início do emprego da C<sub>30</sub>, a qual permite maior seletividade (OLIVER; PALOU, 2000).

A partir de meados da década de 1990, foram desenvolvidas as fases estacionárias C<sub>30</sub>. Este avanço tecnológico proporcionou um significativo aumento de seletividade na separação dos isômeros do licopeno e demais carotenoides.

A Figura 21 mostra a separação de padrões de alguns isômeros do licopeno, obtida por Stahl e Sies (1992). Pode-se observar uma separação com pequena

resolução entre os isômeros Z do licopeno. A fase estacionária C<sub>18</sub> foi utilizada, pois se tratava da única viável para separação das referidas substâncias.

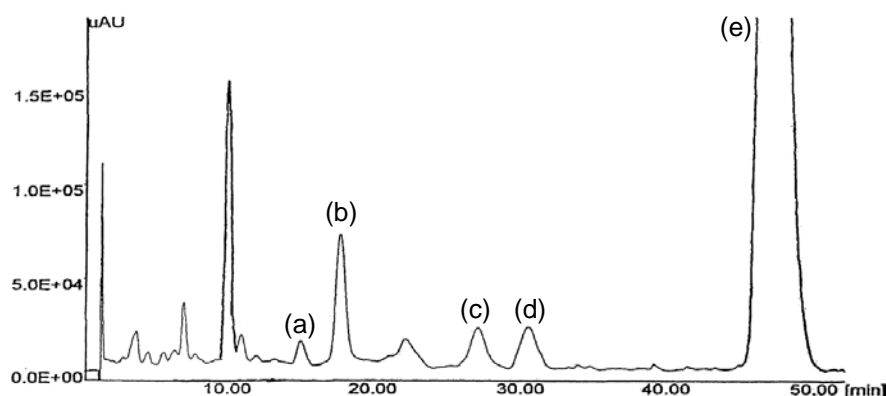
Figura 21 – Separação de isômeros de licopeno em fase estacionária C<sub>18</sub>



Legenda: (a) - (15Z)-licopeno, (b) - (9Z)-licopeno, (c) - (13Z)- licopeno, (d) - (15Z)-licopeno. Sistema cromatográfico: Modo isocrático. Fase estacionária C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm), diâmetro de partícula: 5 µm. Fase móvel: metanol:acetonitrila:diclorometano:água (7:7:2:0,16), fluxo: 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Detector: DAD (460 nm). Volume de injeção: 20 µL.  
Fonte: STAHL et al, 1992.

A Figura 22 exibe a separação de 5 isômeros geométicos do licopeno, obtida por Lin e Chen (2003) em matrizes de suco de tomate. Neste caso é possível observar uma considerável reslução entre os isômeros do licopeno, com o uso da fase estacionaria C<sub>30</sub>. Desta forma, observa-se uma franca evolução da fase estacionária utilizada na separação para substâncias lipofílicas.

Figura 22 – Separação de isômeros de licopeno em fase estacionária C<sub>30</sub>

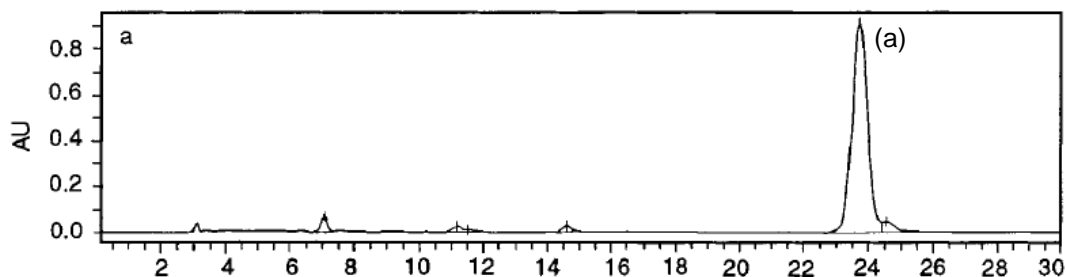


Legenda: (a) - (15Z)-licopeno, (b) - (13Z)-licopeno, (c) - (9Z)-licopeno, (d) - (5Z)-licopeno, (e) - (15E)-licopeno. Sistema cromatográfico: Modo gradiente: Fase estacionária: C<sub>30</sub> (4,6 mm x 250 mm), diâmetro de partícula: 5 µm. Fase móvel: Acetonitrila e butan-1-ol (7:3, v/v) (solvente A) e diclorometano (B). 99% de A e 1% de B (inicial), 4% de B (20 minutos), 50% de B (50 minutos) e 1% de B (55 minutos) fluxo: 2,0 mL.min<sup>-1</sup>. Detector DAD (476 nm). Volume de injeção: 20 µL.

Fonte: LIN e CHEN, 2003.

Algumas pesquisas são direcionadas a estudar corridas cromatográficas mais rápidas, e conseqüentemente, mais econômicas sem comprometer a estabilidade para a análise de licopeno e seus isômeros, como Ishida, Ma e Chan (2001) que utilizou a CLAE e variou temperatura e volume de injeção, de forma a otimizar a análise de (15E)-licopeno e seus isômeros. A matriz da Figura 23 é composta por (15E)-licopeno recristalizado a partir de tomate. Ela ainda exibe o pico relativo à substância majoritária, com tempo de retenção próximo de 24 minutos.

Figura 23 – Cromatograma do (15E)-licopeno em sistema isocrático



Legenda: (a) - (15E)-licopeno. Sistema cromatográfico: Modo isocrático. Fase estacionária: MTBE:metanol:EtOAc (40:50:10), coluna analítica polimérica C<sub>30</sub> (4,6 mm x 250 mm), diâmetro interno de 3 µm.

Fonte: ISHIDA, MA e CHAN, 2001.

### 2.9.2 Avanços na análise de licopeno e seus isômeros

Uma das linhas de pesquisa mais recentes a respeito da análise de carotenoides, incluído os isômeros do licopeno, está ligada diretamente à não degradação destas moléculas por oxidação ao ar, por este motivo, técnicas como a extração por fluido supercrítico, acoplado a CLAE surgem como uma nova opção.

Pól et al (2004) utilizou a CLAE, entretanto fez uso da extração por fluido supercrítico e demonstrou a capacidade que a técnica possui em analisar carotenoides de matrizes vegetais, dentre elas, o tomate. O fluido supercrítico utilizado foi o dióxido de carbono. O sistema possui hifenação com o sistema de CLAE, o qual utiliza uma fase estacionária monolítica C<sub>18</sub> como “trapping”. As vantagens do método estão ligadas à capacidade de extração de licopeno de pele do tomate sem a degradação da matriz por exposição ao ar e à luz, rapidez na análise, e uso de menor quantidade de solvente. Entretanto, a técnica é mais voltada para análise de licopenos totais, já que a técnica não foi capaz de distinguir os isômeros geométricos do licopeno.

A técnica de CLAE hifenada ao espectrômetro de massas (EM) é um desafio para a análise de carotenoides em geral. Pela natureza hidrocarbônica e pela relativa complexidade da matriz, torna-se muito difícil obter resultados de um grupo de moléculas tão lábeis e sem átomos com boa capacidade de adquirir carga. Desta forma, poucos são os trabalhos relacionados com o detector de massas.

Lucini et al (2012) validou a análise de licopeno e β-caroteno em tomates através do acoplamento CLAE-EM por modo de eletronebulização. Apesar do padrão de fragmentação ser semelhante entre isômeros geométricos do licopeno, a diferenciação entre eles foi realizada através dos tempos de retenção dos componentes co-particionados das matrizes. Os limites de detecção e de quantificação foram de 8 ng.g<sup>-1</sup> e 28 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Desta forma, o aumento de sensibilidade do método foi vantajoso, porém sem estabelecer novidades no que diz respeito ao padrão de fragmentação. Comparativamente, Lin e Chen (2009) obteve valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) nos valores de 90 ng.g<sup>-1</sup> e 270 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente, ao utilizar a CLAE-DAD. Assim, os limites de detecção e de

quantificação foram menores na técnica CLAE-EM. Interessante notar também que a referida técnica exige um aparato mais sofisticado, com maiores cuidados em relação aos ruídos causados pela matriz, comparada a CLAE-DAD.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Amostragem no plantio

As áreas de cultivo das amostras de tomate analisados localizaram-se nos estados do Rio de Janeiro, especificamente em Nova Friburgo, e nos estados de Minas Gerais (município de Jequitibá) e São Paulo (município de Ribeirão Preto). Os cultivos tradicional e TOMATEC foram conduzidos em cultivares das mesmas propriedades agrícolas, entretanto, detalhes do plantio e do manejo ainda estão sob sigilo pela EMBRAPA. As amostragens ocorreram na quarta penca de tomates cultivados no ano agrícola de 2012 e 2013. A amostragem ocorreu forneceu cerca de 1,5 kg de frutos, embalados sob o abrigo da luz e imediatamente transportados para o local de análise.

### 3.2 Instalações físicas, materiais e reagentes

#### 3.2.1 Instalações físicas para as análises

Fez-se necessária a utilização de uma sala escura e climatizada para a manipulação de matrizes fotossensíveis. Uma sala com cerca de 10 m<sup>2</sup> foi utilizada, como mostrado na figura 18. Nela estão contidos:

- sistema de refrigeração de ambiente (condicionador de ar);
- iluminação com lâmpadas amarelas;
- capela em fibra de vidro;
- homogeneizador Turrax T18, fabricante IKA;
- linha de gás nitrogênio 5.0 grau analítico.

Figura 24 – Espaço para manipulação de amostras fotossensíveis



### 3.2.2 Equipamentos e vidrarias utilizadas

Para o presente estudo foram utilizados os seguintes equipamentos de análise: cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Waters<sup>®</sup>, espectrofotômetro na faixa de energia do UV-VIS, fabricante Varian, modelo Cary<sup>®</sup>50 e balança eletrônica analítica, fabricante Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AUX220.

A CLAE foi a técnica escolhida para a separação das substâncias contidas nas matrizes utilizadas, além disso, também foi utilizada para quantificar o isômero (15*E*)-licopeno. O espectrofotômetro na faixa de energia do UV-VIS foi empregado para a determinação do teor de (15*E*)-licopeno para a criação das soluções padrões.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência com módulo cromatográfico Alliance<sup>®</sup> modelo e2690, com alça de injeção com volume variado e capacidade de 2000 µL e forno com capacidade de aquecimento de até 65°C. Este sistema encontra-se acoplado ao detector DAD modelo 2998, que permite monitorar na faixa de comprimento de onda de 190 a 700 nm e taxa de aquisição com até 80 Hz. O coletor de frações que está ligado à saída do detector DAD, modelo WFIII<sup>®</sup> é capaz de recolher até 120 frações, todos da marca Waters<sup>®</sup>, conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25 – Sistema cromatográfico



A fase estacionária utilizada foi a de suporte polimérico C<sub>30</sub>, da marca YMC<sup>®</sup>, com dimensões 4,6 mm de diâmetro interno por 250 mm de comprimento, com 3 µm de diâmetro de partícula. O software utilizado para a manipulação dos resultados obtidos foi o Empower<sup>®2</sup>.

O espectrofotômetro Varian Cary<sup>®50</sup> possui lâmpada de xenônio, feixe simples e permite faixas de comprimento de onda de 190 a 1100 nm. As cubetas são de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Utilizou-se equipamento de ultrassom, fabricante UNIQUE, modelo Ultracleaner 700, com capacidade de 500 mL, para a retirada de gases da fase móvel usada em CLAE.

O purificador de água utilizado foi da marca Millipore, modelo Direct 3 UV<sup>®</sup>, a qual forneceu água grau de pureza I.

Foram utilizadas micropipetas monocal, marca Kacil<sup>®</sup>, com os seguintes volumes fixos: 10, 20, 25, 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 µL. Foi utilizado agitador de tubos da marca QUIMIS<sup>®</sup> para a homogeneização.

As demais vidrarias utilizadas básicas para as análises foram funis de separação com 60 mL de capacidade, bastões de vidro, balão volumétrico de 5,00 mL, gral e pistilo.



### 3.2.3 Metodologia para CLAE-DAD

Foi escolhida a metodologia de Sander, Sharpless e Purschl (2000) para o estudo as matrizes de tomate por CLAE-DAD que emprega um gradiente de fase móvel com MeOH e metil-*t*-butil-éter (MTBE) e coluna cromatográfica C<sub>30</sub>.

A análise é iniciada com a maior proporção do componente da fase móvel que possui poder de eluição (MeOH). Com o decorrer do processo cromatográfico, a fase móvel é enriquecida no solvente com menor poder de eluição, no caso MTBE. Este solvente é considerado um diferenciador, já que as substâncias eluem com seletividade quando a fase móvel tem maior proporção de MTBE.

### 3.2.4 Reagentes utilizados

Foram utilizados solventes com grau de pureza cromatográfica para os processos de extração, partição e dissolução das amostras e da substância padrão. A água utilizada para o processo de partição foi a de grau I de pureza. A Tabela 5 mostra os reagentes empregados na manipulação da matriz: extração e partição.

Tabela 5 – Reagentes usados para a extração e partição

| <b>Extração</b>                     | <b>Partição</b>                            |
|-------------------------------------|--|
| Acetona grau cromatográfico (Tedia) | Solução aquosa de cloreto de sódio (Sinth) |
| Celite <sup>®</sup> (Tedia)         | Éter de petróleo (Tedia)                   |
|                                     | Sulfato de sódio anidro (Sinth)            |
|                                     | Água grau de pureza I                      |

Para o sistema das fases móveis do CLAE-DAD foram usados os seguintes solventes: MTBE, fabricante: Tedia e MeOH, fabricante Tedia. Para o sistema de limpeza da agulha de injeção, utilizou-se acetona, fabricante: Vetec. Todos os solventes cotinham grau cromatográfico.

A solução padrão de 15(*E*)-licopeno foi obtida por meio de recolhimento de fração por corrida cromatográfica a partir do tratamento da matriz do fruto e melão de São Caetano, como descrito nas seções de 3.3.1.1 a 3.3.2.3

### **3.3 Matrizes**

#### **3.3.1 Manipulação das matrizes**

Neste trabalho, as matrizes manipuladas se dividem em dois tipos: A amostra de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e o fruto conhecido como melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) do qual foi extraída a substância (15*E*)-licopeno, para utilização como padrão cromatográfico.

Todas as etapas de tratamento das matrizes foram realizadas em ambiente climatizado e evitou-se ao máximo a exposição das matrizes e dos respectivos extratos à luz e ao ar por longos períodos durante a manipulação, com o cuidado em evitar degradação fotoquímica e térmica. As matrizes sofreram os seguintes processos básicos de manipulação: A moagem, extração, partição e filtração.

##### **3.3.1.1 Padrão cromatográfico**

O (15*E*)-licopeno utilizado como padrão cromatográfico foi extraído dos arilos das sementes do melão de São Caetano, como exibido na Figura 26. Este fruto em particular possui alto teor de (15*E*)-licopeno (maior que 90% da concentração dos carotenoides totais). A concentração do licopeno encontrado em arilos de melão de São Caetano (MSC), o qual varia de 49,7 a 55,9 mg/100 g (PACHECO, 2009).

Comparativamente, o tomate possui em torno de 9,7 a 11,84 mg/100 g (LIN; CHEN, 2003).

Os arilos do melão de São Caetano sofreram separação entre a polpa e as sementes. Pesou-se aproximadamente 1 g da polpa dos arilos e estes foram transferidos para conjunto de graal e pistilo em cerâmica. Ao conjunto foram adicionados cerca de 300 mg de Celite<sup>®</sup>. Todo o material sofreu maceração.

Figura 26 – Fruto maduro do melão de São Caetano com os arilos expostos



Fonte: Pacheco, 2009.

#### 3.3.1.2 Extração de licopeno do melão de São Caetano

Ao conjunto foi adicionada uma alíquota com cerca de 5 mL de acetona. Posteriormente, o solvente foi transferido para conjunto de filtração com kitassato de 500 mL com trompa de vácuo, acoplada a Filtro com placa de vidro sinterizado de porosidade 4 e capacidade de 150 mL. O material retido no filtro foi repetidamente recolhido, macerado em graal e readicionado com uma nova alíquota de 5 mL de acetona e novamente submetido à filtração sob vácuo. O processo se repetiu até não haver formação de coloração intensa ao final do maceramento.

### 3.3.1.3 Partição da matriz de melão de São Caetano

O filtrado recolhido foi transferido para um funil de separação de 60 mL, o qual já continha previamente cerca de 5 mL de éter de petróleo e 20 mL de solução salina de cloreto de sódio a 5% (m/v). A fase aquosa foi recolhida e descartada. Mais 4 adições de solução salina foram realizadas. A cada adição, o sistema foi ligeiramente agitado de forma a não atingir a parte superior do funil de decantação, como mostrado pela Figura 27.

Figura 27 – Sistema utilizado na partição melão de São Caetano



Ao fim, toda a solução salina de cloreto de sódio foi descartada. A fase etérea foi recolhida para recipiente de vidro o qual continha cerca de 1 g de sulfato de sódio anidro. O recipiente foi fechado com tampa de borracha, foi levemente agitado e aguardou-se cerca de 2 minutos. O conteúdo deste recipiente foi retransferido para outro sem o sulfato de sódio.

O conteúdo foi seco com corrente de nitrogênio. O sólido foi resolubilizado com acetona grau espectroscópico ao volume de 5 mL. O conteúdo foi submetido a cerca de 5 minutos de agitação em agitador de tubos de ensaio. Em seguida, filtrou-se parte do conteúdo em unidade filtrante em politetra fluoro etileno (PTFE) com 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e recolheu-se o filtrado em frascos para CLAE de 2 mL.

### 3.3.2 Sistema CLAE-DAD para obtenção de solução estoque

A matriz preparada nas seções de 3.3.1.1 a 3.3.1.3 foi submetida ao sistema CLAE-DAD. As fases móveis obedeceram a um sistema de gradiente, como exibido na Tabela 6. As condições cromatográficas são as seguintes:

- volume de injeção: 1500  $\mu\text{L}$ ;
- fluxo: 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- tempo de corrida: 25 minutos;
- temperatura da coluna: 33  $^{\circ}\text{C}$ ;
- temperatura do amostrador: 15  $^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 6 – Gradiente utilizado para a análise das matrizes

| Tempo | MTBE (%) | MeOH (%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 30       | 70       |
| 14    | 95       | 5        |
| 16    | 30       | 70       |
| 20    | 30       | 70       |

Recolheu-se 2,5 mL do eluato sob a janela temporal entre 21 e 24 minutos. Levou-se em consideração o tempo gasto entre a detecção e a passagem do eluato na válvula coletora do módulo WFIII<sup>®</sup>. Verificou-se o espectro de varredura criado pelo intervalo de comprimento de onda entre 600 e 300 nm de maneira a verificar a similaridade com o espectro do (15*E*)-licopeno em éter de petróleo grau espectroscópico. Realizaram-se 2 injeções consecutivas para recolhimento de quantidade de eluato. O fluxograma 1 mostra, de maneira simplificada o tratamento do MSC para a obtenção da SE.

Os conteúdos dos eluatos sofreram mistura em recipiente de vidro com tampa de borracha. Desta forma, criou-se a SE. Desta, retirou-se 3 alíquotas em micropipeta de 500  $\mu\text{L}$  e transferiu-se os mesmos para 3 recipientes de vidro distintos e identificados como SE<sub>1</sub>, SE<sub>2</sub> e SE<sub>3</sub>, respectivamente. Cada um foi seco com nitrogênio e a eles foram adicionados 5,00 mL de éter de petróleo grau espectroscópico com pipeta volumétrica.

Os conteúdos foram ressolubilizado em agitador de tubos de ensaio por 3 minutos cada e, logo em seguida, os mesmos sofreram leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm. Os valores da absorção foram registrados e o teor do licopeno foi calculado, conforme a equação (1) para cada frasco.

O teor de (15*E*)-licopeno é calculado a partir da Equação 1:

$$[\mu g . mL^{-1}] = \frac{A . Dil . 10^4}{\epsilon_{1cm}^{1\%}} \quad (1)$$

Onde:

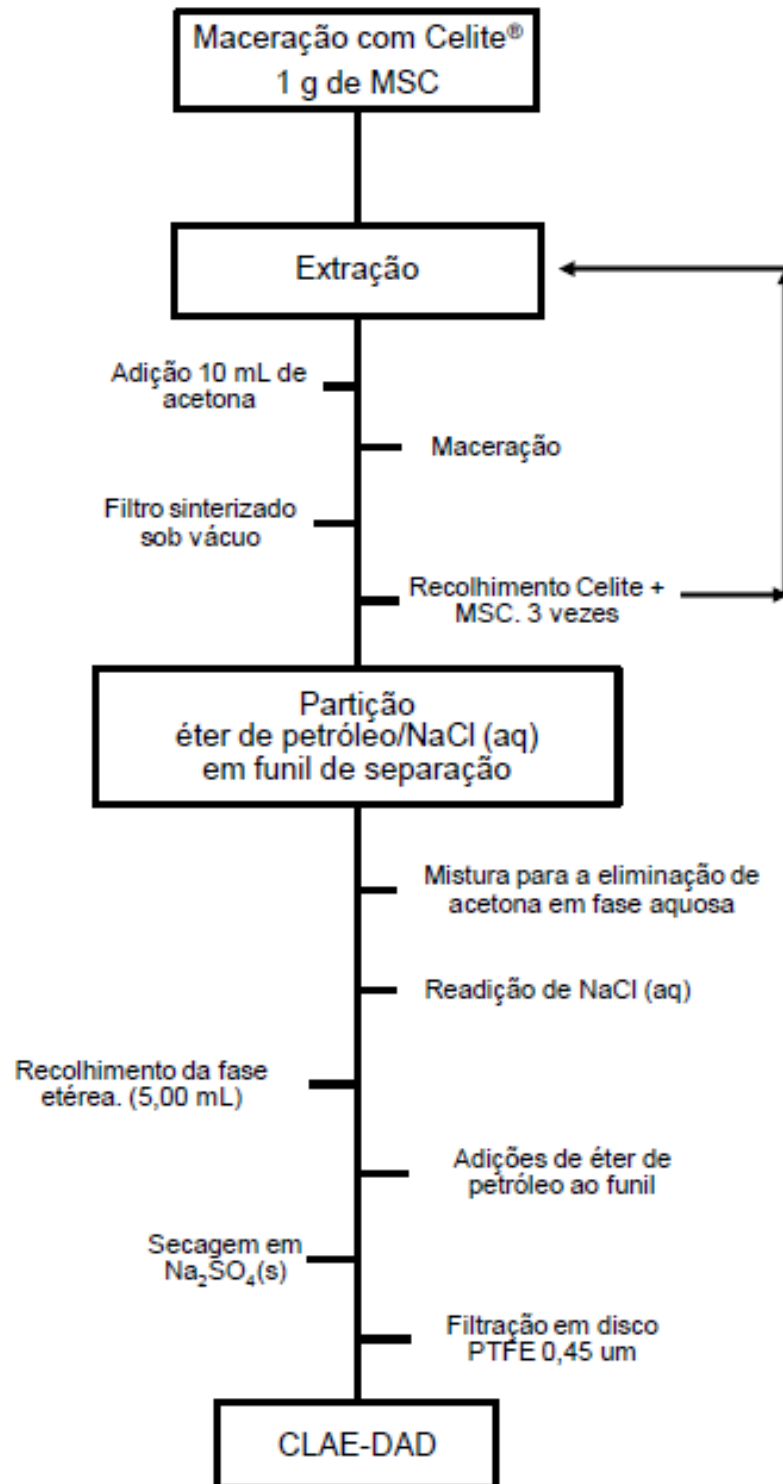
A: Absorvância medida

Dil: Diluição sofrida pelo analito para a leitura em espectrofotômetro

$\epsilon_{1cm}^{1\%}$  : Absortividade específica do licopeno (3540)

As concentrações de (15*E*)-licopeno em SE<sub>1</sub>, SE<sub>2</sub> e SE<sub>3</sub> foram determinadas através da absortividade molar do licopeno em 470 nm de comprimento de onda ( $\epsilon_{1cm}^{1\%} = 3450$ ), em éter de petróleo (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A diluição foi realizada de forma que as leituras em espectrofotômetro fosse realizada dentro do intervalo entre 0,200 a 0,800 unidade de absorvância, de forma a obedecer a lei de Lambert-Beer. Realizou-se o teste estatístico para verificação de valores discrepantes e a média dos resultados para a obtenção do teor da SE. A figura 28 mostra o processo simplificado da produção da SE.

Figura 28 – Esquema simplificado da produção da solução estoque



As soluções geradas a partir de diluições da SE foram consideradas como solução de trabalho (ST). As soluções de trabalho foram usadas para a validação do

método analítico proposto e sofreram as diluições, em triplicatas verdadeiras para a construção da curva analítica.

### 3.3.3 Manipulação das amostras de tomate

Na amostragem, foram selecionados 5 tomates inteiros ao acaso e utilizou-se uma faca de corte caseira de forma que cada fruto fosse longitudinalmente cortado em 4 partes simétricas. Duas partes opostas da totalidade de quatro foram escolhidas para o processo de trituração.

Para o processo de trituração, as partes amostradas foram cortadas em pedaços menores, com cerca de 5 cm de comprimento. O material foi recolhido em becher plástico de 500 mL. Utilizou-se o homogeneizador Turrax<sup>®</sup> T18, por cerca de 5 minutos, com 2000 RPM e ao abrigo da luz.

A partir da matriz homogeneizada, pesou-se cerca de 300,0 mg da amostra em duplicata e com exatidão para tubo eppendorf de 2 mL. O material sofreu, logo em seguida, adição imediata de 1 mL de acetona grau cromatográfico.

#### 3.3.3.1 Extração da matriz de tomate

Para a extração da matriz, foi utilizada 1,0 mL de acetona grau cromatográfico. Usou-se a ponta do bastão de vidro de 10 mm de diâmetro para promover a extração por atrito junto à parede e ao fundo do tubo tipo eppendorf. Após isto, o mesmo tubo foi centrifugado a 50.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido com micropipeta de 500 µL para funil de separação de 60 mL, o qual continha o sistema bifásico formado por 20 mL de solução aquosa salina de NaCl a 5% (m/v) e 2 mL e éter de petróleo. Novos processos de extração à matriz contida no tubo eppendorf, com o



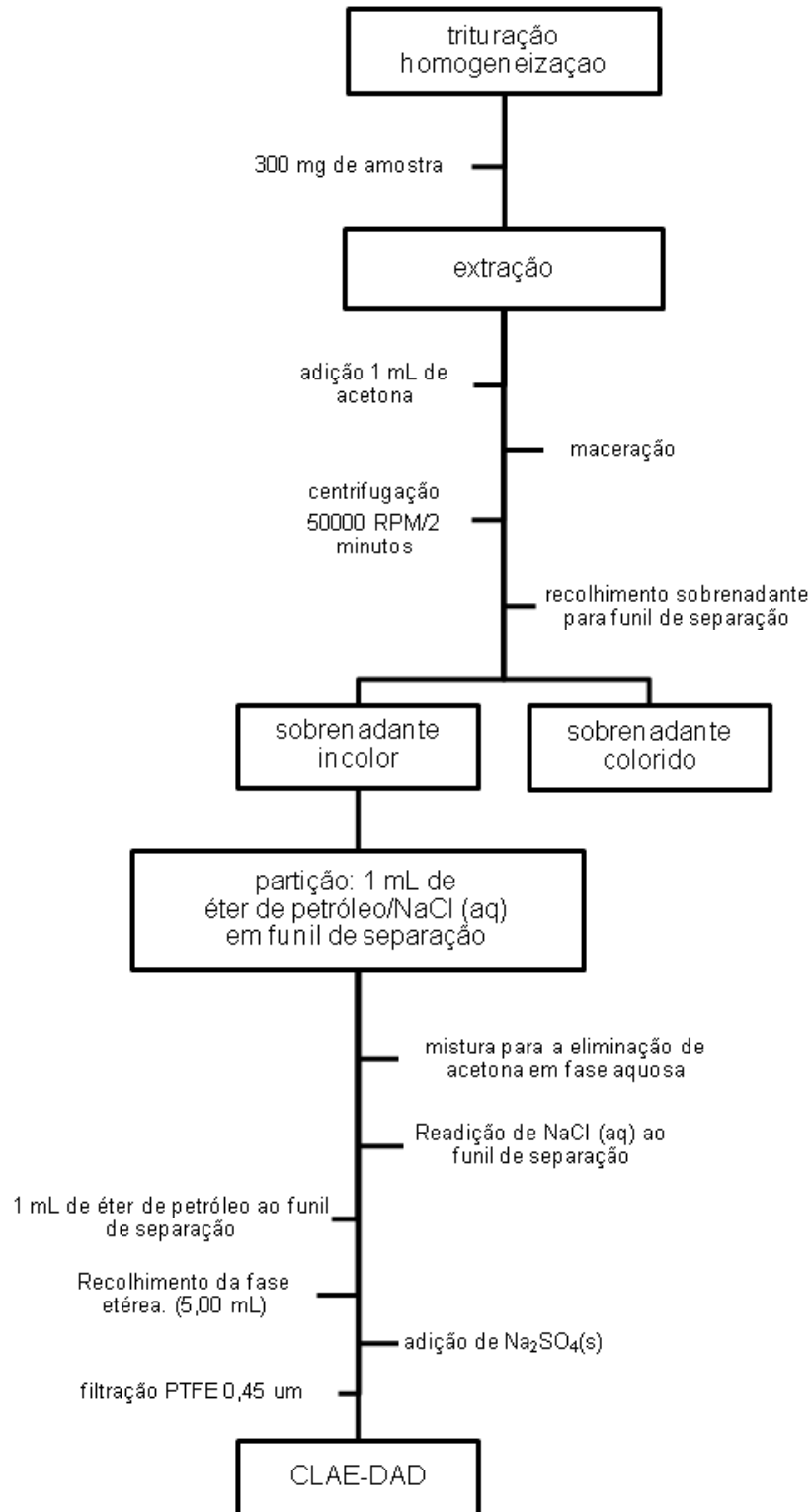
mesmo sistema de solventes, foram repetidos até o total desaparecimento da coloração predominantemente amarela.

### 3.3.3.2 Partição da matriz de tomate

Os extratos centrifugados e transferidos para o sistema de partição, como descrito na seção 3.3.2.2, sofreram leve agitação circular, de modo que a acetona foi carregada da fase etérea para a fase aquosa salina. A fase inferior deste sistema foi descartada de forma a eliminar a acetona. Novas adições com cerca de 20 mL de solução salina foram repostas, cuidadosamente, ao funil de separação. Após 4 processos de adição de solução salina, o sobrenadante foi retirado por meio de micropipeta de 500  $\mu$ L e transferido diretamente para balão volumétrico de 5,00 mL. Mais dois processos de adição e recolhimento da fase etérea foram realizadas de forma a garantir a transferência quantitativa do conteúdo da matriz.

O balão volumétrico de 5,00 mL foi completado ao volume com éter de petróleo e homogeneizado. Após este processo, cerca de 200 mg de sulfato de sódio anidro foi adicionado ao balão volumétrico. O sistema ficou em repouso por cerca de 5 minutos. O líquido sofreu filtração em membrana de 0,45  $\mu$ m em PTFE. Retirou-se uma alíquota de 400  $\mu$ L do filtrado e submeteu-se o mesmo à secagem com nitrogênio. O secado foi ressolubilizado com 200  $\mu$ L com acetona grau cromatográfico em redutor de volume de frasco de injeção, vedado e submetido a agitação por vórtex por 3 minutos. A figura 29 mostra o processo simplificado da manipulação das matrizes de tomate.

Figura 29 – Esquema simplificado da manipulação das matrizes de tomate



### 3.4 Validação

A validação do método foi parcial, a qual obedeceu alguns critérios do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), baseado em seu guia para validação (INMETRO, 2011). Este Instituto regulador indica o cumprimento dos seguintes critérios de desempenho: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e recuperação para a validação do método empregado em que a substância a ser quantificada, (15*E*)-licopeno, está em nível de traço na matriz do tomate (concentração menor que 0,01%), de acordo com o INMETRO, 2011.

Após a validação parcial do método proposto, foram calculados os teores da forma isomérica de licopeno em maior concentração: o (15*E*)-licopeno. Com intuito de observar a influência dos diferentes manejos, tradicional ou Tomatec, no teor de (15*E*)-licopeno na matriz de tomate. Para tal serão usadas ferramentas estatísticas que permitirão inferir os julgamentos.

#### 3.4.1 Seletividade

A seletividade foi verificada por meio do uso do sistema cromatográfico como descrito na seção 3.3.2.3. pela observação da resolução entre os picos das substâncias encontrados na matriz, comprovados pelos espectros de varredura característicos na faixa de comprimento de onda UV-VIS.

Apesar do INMETRO indicar o uso do material de referência, tal procedimento não foi usado por se tratar de uma substância extremamente lábil às condições ambientais, desta forma, o transporte deste tipo de substância favorece a degradação do mesmo. Logo, optou-se por analisar a matriz de interesse similarmente ao que a literatura já propôs como Sander, Sharpless e Purschl (2000) e Pacheco (2009), os quais confirmaram a pureza do (15*E*)-licopeno por identificação espectroscópica, na faixa de comprimento de onda do visível.

O erro relativo (ER) entre a razão Q calculada e a razão Q da literatura utiliza a fórmula (INMETRO, 2011), através da Equação 2:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:  $X_{lab}$ : Medida laboratorial;  
 $X_v$ : Valor verdadeiro.

### 3.4.2 Estudo da linearidade e Faixa de trabalho

O estudo da linearidade e da faixa de trabalho foi realizado com a construção da curva analítica de ST preparadas a partir da SE de (15E)-licopeno, dissolvido em acetona grau espectroscópico. Foram avaliadas soluções padrão em 5 níveis de concentração, em triplicatas genuínas e ordem aleatória. Essas soluções foram denominadas A (de maior concentração) à E (de menor concentração), e preparadas como descrito na seção 3.3.2.3. As ST foram submetidas à metodologia proposta. Os resultados das áreas obtidas por meio do software Empower<sup>®</sup>2 foram registradas. Em posse de tais informações, foi construída a curva analítica, com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007, o qual forneceu o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

A linearidade da faixa de trabalho foi verificada através da obtenção da curva analítica, de acordo com a Equação 3.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i \quad (3)$$

Onde:  $y_i$ : resposta da medida;

$\beta_0$ : coeficiente linear;

$\beta_1$ : coeficiente angular (sensibilidade);

$x_i$ : concentração.

A curva analítica foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r). Para cada nível foi verificado a presença de valores

discrepantes, por meio do teste de Grubbs, assim como a homocedasticidade, por meio do teste de Cochran, dos dados gerados para a confirmação da curva analítica construída.

A faixa de trabalho utilizada para o método de análise proposto foi baseada na possibilidade de uma larga faixa de concentração de (15*E*)-licopeno na matriz em função das diferenças de manejo.

#### 3.4.3 Limite de detecção

O LD é baseado no conhecimento do menor valor de concentração da substância de interesse ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Foram produzidas diluições verdadeiras da ST de menor nível, de modo a se obter uma relação do sinal 3 vezes maior que o valor do ruído para o (15*E*)-licopeno. Foram realizadas 7 corridas cromatográficas, com o método proposto. O desvio padrão relativo foi avaliado.

#### 3.4.4 Limite de Quantificação

Foi adotada uma das formas indicadas pelo INMETRO para a determinação do limite de quantificação (LQ), em matrizes em nível de traço, que é admitir o valor da concentração do nível mais baixo da curva analítica.

### 3.4.5 Precisão

Foi realizado o teste de precisão intracorrída, e foi expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR), segundo a Equação 4:

$$DPR(\%) = \frac{DP \cdot 100}{CMD} \quad (4)$$

Onde: DP = desvio padrão;  
CMD = concentração média determinada.

#### 3.4.5.1 Repetitividade

É uma das formas de se exprimir a precisão. Ela é expressa em relação à característica da dispersão dos resultados quantitativos e pode ser determinada por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas de (15E)-licopeno, localizadas na faixa de trabalho.

As condições de repetitividade foram caracterizadas por utilizar: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível.

Foram realizadas 7 determinações de um nível de concentração de (15E)-licopeno da ST, com corridas cromatográficas aleatórias e verificou-se o DPR dos mesmos.

### 3.4.6 Tendência

A tendência do método foi avaliada através da comparação entre valores de concentração de (15E)-licopeno esperados comparados aos observados. A tendência,

quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

A tendência é calculada através da Equação 5.

$$Tendência(\%) = \frac{V_{obs}}{V_{teo}} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde:  $V_{obs}$ : valor observado  
 $V_{teo}$ : valor teórico

A determinação da concentração de (15E)-licopeno na amostra sem a adição de ST, assim como a determinação na amostra com ST fizeram uso a partir da equação da curva analítica. O termo  $V_{obs}$  é a resposta, em concentração, da amostra com adição conhecida de ST e o termo  $V_{teo}$  representa a concentração da amostra com adição conhecida de ST de forma teórica. Desta forma, utilizou-se a adição da ST, em triplicata verdadeira, para a verificação da tendência.

### 3.4.7 Recuperação

A avaliação da eficiência do processo de extração empregado foi realizada pelo teste de recuperação. Fez-se uso da adição de diferentes níveis de concentração a partir de uma solução de trabalho de SE à amostra. A recuperação foi determinada segundo a Equação 6.

$$Recuperação(\%) = \frac{C_{ST+Am} - C_{Am}}{C_{ST}} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:  $C_{ST+Am}$  = Concentração da (15E)-licopeno extraído;  
 $C_{Am}$  = Concentração de (15E)-licopeno presente na amostra;  
 $C_{ST}$  = Concentração de (15E)-licopeno não extraída (solução padrão adicionada).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção do padrão de (15E)-licopeno a partir do Melão de São Caetano

#### 4.1.1 As metodologias de extração e partição

Os processos de extração dos carotenoides e sua partição foram baseados nas metodologias de Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). A acetona grau HPLC foi utilizada como solvente de extração das matrizes, tanto de tomate como também na obtenção da solução padrão de licopeno, a partir do melão de São Caetano. Em geral, utilizam-se solventes oxigenados para penetrarem nas estruturas celulares e dissolver as substâncias de interesse. Utilizam-se também materiais inertes, abrasivos e finamente divididos para a abertura das paredes celulares para as matrizes em estudo.

Para a partição, foi utilizado o sistema salino aquoso em cloreto de sódio e éter de petróleo em funil de separação de 60 mL, tanto para as matrizes como o padrão. Tais sistemas de solventes para este processo de separação de fases estão amplamente solidificados no que tange a análise de carotenoides.

#### 4.1.2 Escolha do padrão de trabalho

O método analítico foi desenvolvido com a utilização do fruto MSC, para a obtenção do (15E)-licopeno. A extração de substâncias de interesse analítico é amplamente aplicada por sua obtenção rápida e barata, além do emprego direto na purificação e preparo de SE e ST. A Embrapa Agroindústria de alimentos, sediada em Guaratiba – RJ desenvolve este tipo de trabalho. O mesmo pode ser confirmado por Pacheco, 2009.



## 4.2 Validação da metodologia desenvolvida e avaliação dos critérios de desempenho

A validação consiste em um conjunto de testes experimentais que garantem que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida, atendendo as exigências das aplicações analíticas, estabelecidas pela legislação vigente, e assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; RIBANI et al, 2004).

Foi utilizado o Guia de Orientação sobre validação de métodos analíticos do Inmetro, Resolução DOQ-CGCRE-008, de 04 de julho de 2011 (INMETRO, 2011). A validação do método analítico torna-se necessária para obtenção de resultados confiáveis, para a quantificação do (15E)-licopeno, na matriz proposta.

Os parâmetros analíticos foram avaliados segundo o ensaio do tipo I que determina o componente em maior teor, neste caso, em relação aos demais carotenoides presentes na matriz Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, a linearidade, a faixa de trabalho, a precisão, os limites de detecção e quantificação, a exatidão, e a recuperação (INMETRO, 2011).

O objetivo da validação da metodologia desenvolvida foi garantir a confiabilidade dos dados experimentais obtidos e inferir sobre a influencia dos diferentes manejos da cultura tomateira na concentração de (15E)-licopeno.

### 4.2.1 Seletividade

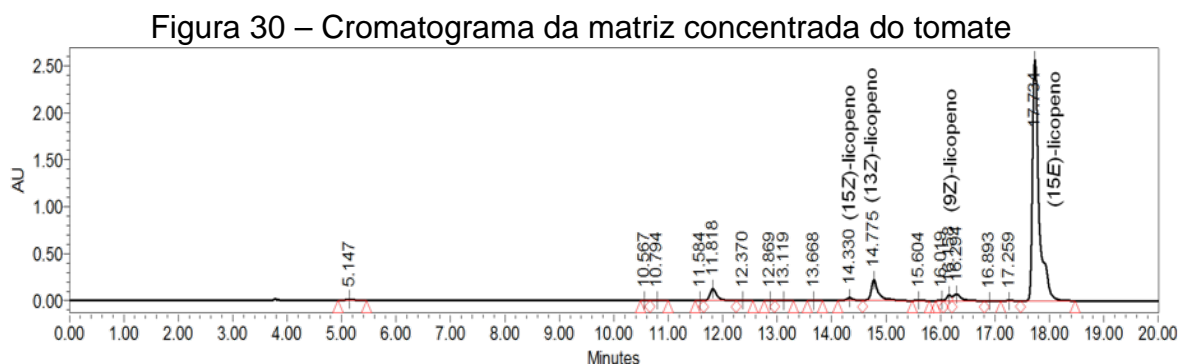
O desempenho na medição da substância de interesse pode ser comprometido devido a presença de outras substâncias presentes na matriz com características químicas semelhantes, denominadas interferentes. Estes podem aumentar ou reduzir o sinal cromatográfico indicando um erro na determinação, neste caso, de (15E)-licopeno (INMETRO, 2011).

O teste de seletividade tem como objetivo verificar se o método é capaz de produzir respostas para substâncias com características comuns e distingui-las umas

das outras. O INMETRO ressalta que se a seletividade do método não for assegurada, outros parâmetros como linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidos.

A literatura descreve que a seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser estabelecido para a validação do método desenvolvido (CASSIANO et al., 2009). O sistema cromatográfico empregado na análise da matriz do tomate pode ser observado das seções 3.3.3 a 3.3.3.2. A única intervenção necessária frente à análise proposta foi relacionada à concentração da matriz. Para o teste de seletividade, foi necessário injetar a matriz cerca de 5 vezes mais concentrada que a diluição de trabalho. Este procedimento diferenciado se fez necessário para a obtenção dos espectros UV-VIS dos picos minoritários da matriz.

Outra forma de comprovação de seletividade foi a diferenciação dos picos encontrados na matriz entre substâncias estruturalmente similares, diferenciadas apenas pela isomeria geométrica. A injeção foi realizada com a matriz cerca de 5 vezes mais concentrada que a diluição de trabalho. Tal procedimento foi necessário para a obtenção dos espectros UV-VIS dos picos identificados, conforme exibido na Figura 30.



Legenda – Cromatograma da matriz do tomate concentrado nas condições cromatográficas do método proposto.

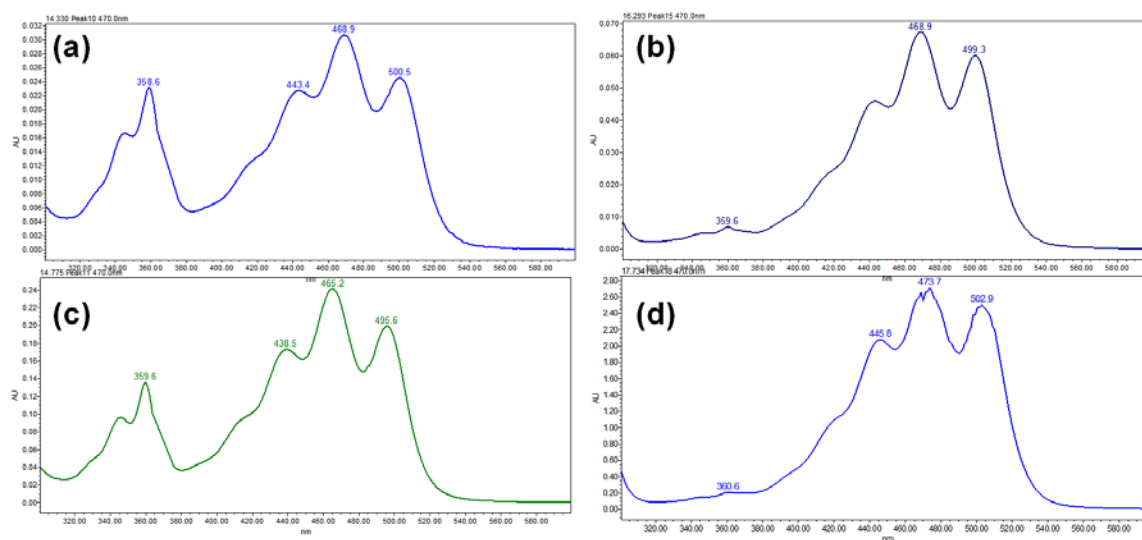
A figura 30 exibe os picos referentes as substâncias mais próximas estruturalmente ao (15E)-licopeno, estão satisfatoriamente separados, conforme mostra a Tabela 7. A Figura 31 exibe os formatos dos espectros extraídos nos tempos de retenção exibidos na Tabela 6. A forma de identificação utilizada fez uso do valor Q da literatura, na seção 2.6.1, tabela 4. O erro relativo (ER) entre a razão Q calculada e o a razão Q da literatura utiliza a fórmula (INMETRO, 2011).

Tabela 7 – tempos de retenção dos isômeros do licopeno identificados

| Tempo de retenção | Substância     | Razão Q | ER    |
|-------------------|----------------|---------|-------|
| 14,33             | (15Z)-licopeno | 0,74    | 1,35  |
| 14,76             | (13Z)-licopeno | 0,58    | 3,57  |
| 16,29             | (9Z)-licopeno  | 0,08    | 12,25 |

Consideram-se os valores da razão Q calculado semelhantes aos da razão Q da literatura em função da proximidade dos valores absolutos. Em relação ao ER, nota-se o maior valor para o isômero (9Z)-licopeno. Deve-se levar em consideração que os valores numéricos das referidas razões são baixos, logo, mesmo pequenas variações absolutas podem resultar em um valor de ER alto, comparado aos demais isômeros.

Figura 31 – Espectros de UV-VIS para os isômeros do licopeno identificados

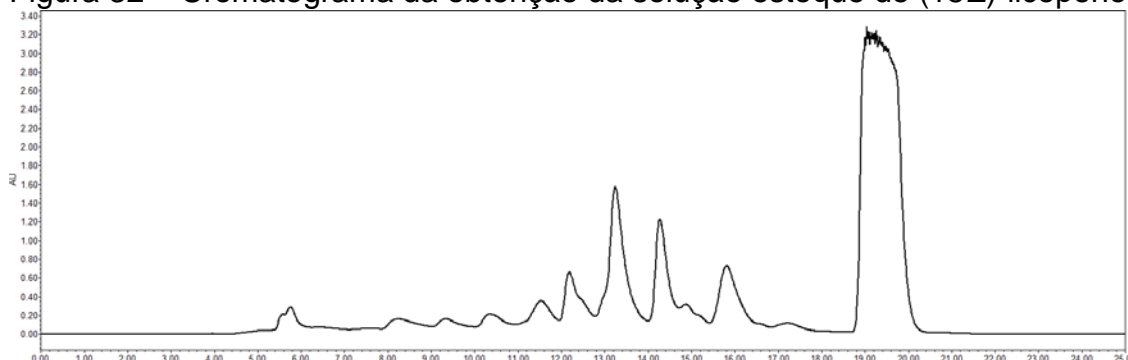


Legenda - (a): (15Z)-licopeno; (b): (13Z)-licopeno; (c): (15Z)-licopeno, (d)- (15E)-licopeno.

#### 4.2.2 Solução estoque

O eluato foi recolhido em tubo tipo eppendorf, através do módulo WFIII<sup>®</sup> do sistema cromatográfico, como descrito na seção 3.3.2.3. O registro da separação está apresentado, através do cromatograma exibido, entre aproximadamente 18,5 e 20,5 minutos, pela Figura 32.

Figura 32 – Cromatograma da obtenção da solução estoque de (15E)-licopeno



Legenda: Em destaque a janela de recolhimento do (15E)-licopeno. Cromatograma da matriz do tomate concentrado. Condições de análise: Coluna analítica: C<sub>30</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), volume de injeção: 1500 μL, temperatura da coluna: 33 °C, temperatura do amostrador: 15 °C, fluxo: 1,0 mL/min, fase móvel: metanol (solvente A) e MTBE (solvente B); programa de gradiente: 70:30 (A:B) inicial. Da condição inicial (70:30) para (5:95) em 14,00 minutos, em 14,01 restaurada a (70:30) até 16 minutos e de 16,01 a 20 minutos o sistema foi mantido a (70:30). Janela de recolhimento entre 18,00 e 21,00 minutos.

O eluato recolhido no procedimento 3.3.2.3 foi amostrado em triplicata, sexto em gás nitrogênio, diluído em éter de petróleo grau cromatográfico e homogeneizado. As respectivas soluções sofreram leituras em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 470 nm. A Tabela 8 mostra os valores das absorvâncias e as respectivas concentrações, regidas pela Equação 1 para a determinação quantitativa da SE.

Tabela 8 – Resultado da Quantificação da solução estoque

|                 | <b>Absorvância</b> | <b>Concentração (μg.mL<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------|--------------------|--|
| SE <sub>1</sub> | 0,2912             | 8,44                                     |
| SE <sub>2</sub> | 0,2899             | 8,40                                     |
| SE <sub>3</sub> | 0,2870             | 8,32                                     |
|                 | Média              | 8,39                                     |

#### 4.2.3 Preparo das soluções de trabalho

A partir da SE, de concentração 8,39 μg.mL<sup>-1</sup>, formaram-se as ST por diluição com acetona grau espectroscópico. Formaram-se 5 níveis de concentração, em triplicatas verdadeiras, e foram submetidas à corridas cromatográficas como descrito

pela metodologia empregada. As ST foram nomeadas, em seus níveis de A e E, conforme a tabela 9.

Tabela 9 – Apresentação da nomenclatura das soluções de trabalho em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

| A    | B    | C    | D    | E    | F    |
|------|------|------|------|------|------|
| 8,39 | 6,72 | 5,04 | 3,36 | 1,68 | 0,34 |

#### 4.2.4 Estudo da linearidade

Este teste apresenta a capacidade da metodologia analítica de oferecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo na matriz, dentro de um intervalo especificado de concentração especificado (RIBANI et al, 2004).

Para o estudo da linearidade do método foram obtidas 3 curvas analíticas pelo método de padronização externa, que consiste na injeção de ST, em diferentes níveis de concentração. É recomendada a análise de no mínimo 5 concentrações distintas do padrão que se deseja quantificar (INMETRO, 2011). Assim, foram preparadas quinze ST para análise de 5 níveis de concentração. Para cada nível de concentração foram preparadas 3 replicatas autênticas. Os cromatogramas das ST (A a E) utilizados para a construção da curva analítica 1, apresentados no apêndice 7.1.

A qualidade dos resultados obtidos foi analisada pelos testes de Grubbs, em seguida a linearidade foi verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (CUSTÓDIO; ANDRADE e AUGUSTO, 1997).

O teste estatístico de Grubbs, recomendado pela *International Organization for Standardization* (ISO), foi utilizado para detecção de valores discrepantes antes de proceder à interpretação dos resultados obtidos (HIBBERT; GOODING, 2006). Este teste consiste em relacionar a diferença entre o valor disperso (suspeito) e a média do conjunto de valores obtidos com o desvio padrão do mesmo conjunto de resultados, de acordo com a Equação 6:

$$G_{calc} = \frac{(\text{valorsuspeito} - \bar{y})}{s} \quad (6)$$

Onde:

$\bar{y}$  = média das áreas obtidas em cada nível de concentração;

As áreas obtidas a partir da injeção de cada solução padrão preparada, a média, o DP são apresentadas na Tabela 10.

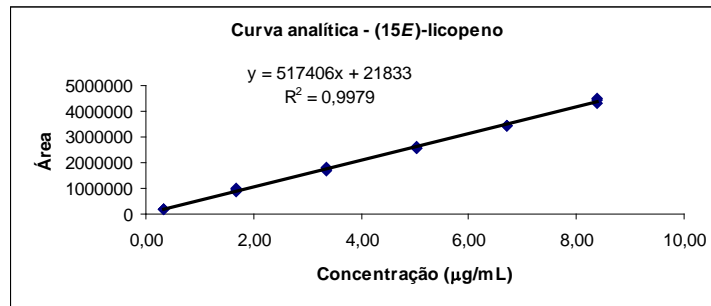
Tabela 10 – Estudo da linearidade e resultados de áreas para as soluções padrão de (15E)-licopeno e teste de Grubbs

| Soluções padrão de (15E)-licopeno            |         |         |         |         |         |        |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
|  | SOL A   | SOL B   | SOL C   | SOL D   | SOL E   | SOL F  |
| <b>Curva 1</b>                               | 4419535 | 3440008 | 2653688 | 1688541 | 1023222 | 165852 |
| <b>Curva 2</b>                               | 4311491 | 3432003 | 2574684 | 1835513 | 900550  | 165866 |
| <b>Curva 3</b>                               | 4515395 | 3447165 | 2582865 | 1763659 | 942169  | 161752 |
| <b>Média</b>                                 | 4415474 | 3439725 | 2603746 | 1762571 | 955314  | 164490 |
| <b>DP</b>                                    | 102013  | 7585    | 43444   | 73492   | 62383   | 2371   |
| Teste de Grubbs                              |         |         |         |         |         |        |
| <b>Curva 1</b>                               | 0,040   | 0,037   | 1,150   | -1,007  | 1,089   | 0,461  |
| <b>Curva 2</b>                               | -1,019  | -1,018  | -0,669  | 0,993   | -0,878  | 0,686  |
| <b>Curva 3</b>                               | 0,979   | 0,981   | -0,481  | 0,015   | -0,211  | -1,147 |
| <b>G<sub>tabelado</sub> (3, 95%) = 1,154</b> |         |         |         |         |         |        |

Para determinações em triplicatas, o valor de  $G_{\text{tabelado}}$  é 1,154 com 95% de confiança, de acordo com Hibbert e Gooding (2006) além de Miller e Miller (2010). Este valor foi comparado ao valor de  $G_{\text{tabelado}}$ . De acordo com os resultados obtidos na Tabela 5, não foram encontrados valores dispersos ao final das análises, pois todos os valores de  $G_{\text{calculado}}$  foram inferiores ao valor de  $G_{\text{tabelado}}$ . Assim, todos os resultados foram utilizados para a construção da curva analítica.

O gráfico 5 apresenta a curva analítica e a equação do modelo linear obtidas com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007.

Gráfico 5 – Curva analítica do (15E)-licopeno obtido por padronização externa

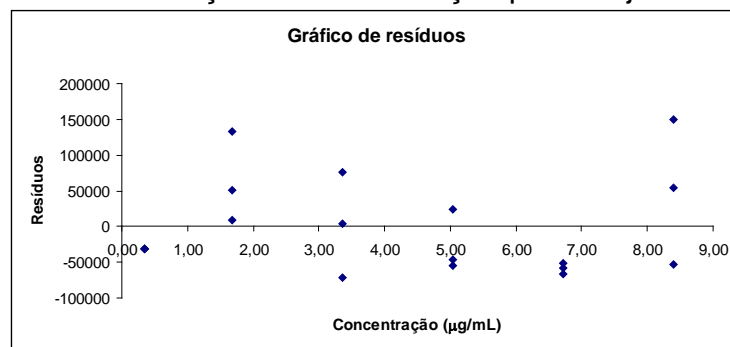


O Inmetro indica a análise dos resíduos e do coeficiente de correlação para confirmação do modelo linear, inicialmente proposto.

O resíduo é a diferença entre os valores observados (experimentais) e previstos pelo modelo para a variável dependente,  $y$ . O gráfico 6 apresenta os resíduos em função da concentração.

A análise do gráfico apresentado na Figura 16 pode indicar uma certa tendência entre os resíduos, o que caracterizaria um comportamento heterocedástico. Para avaliar a homogeneidade da variância dos resíduos da regressão da curva analítica foi empregado o teste estatístico de Cochran.

Gráfico 6 – Resíduos em função da concentração para o ajuste do modelo linear



O teste de Cochran consiste na comparação dos valores de  $C_{\text{calculado}}$  e  $C_{\text{tabelado}}$  em nível de 1% ou 5% de significância (MILLER; MILLER, 2010). O valor de  $C$  é calculado segundo a equação 7.

$$C_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{\sum s^2} \quad (7)$$

Onde:  $s_{\text{máx}}^2$  = Maior valor de variância encontrada nos resultados obtidos;  
 $\sum s^2$  = Somatório das variâncias de todas as medidas.

A maior variância foi encontrada para as medidas realizadas com a solução C e a partir desta foi determinado o coeficiente de Cochran ( $C_{\text{calculado}}$ ). De acordo com os resultados da Tabela 8, os resíduos apresentam comportamento homocedástico (variância constante), já que  $C_{\text{calculado}}$  (0,4804) é menor que o valor de  $C_{\text{tabelado}}$  (0,6161) em 5% de significância (KANJI, 2006). Assim, a linearidade da faixa de trabalho é confirmada, já que os resíduos são independentes e encontram-se aleatoriamente distribuídos em torno do zero.

Tabela 11 – Avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos da regressão da curva analítica através do teste de Cochran

| Avaliação dos resíduos - Homocedasticidade                   |                      |                   |                   |                   |                   |                   |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | SOL A                | SOL B             | SOL C             | SOL D             | SOL E             | SOL F             |
| Curva 1  | 54388,05             | -58794,13         | 24128,17          | -71776,53         | 132146,77         | -31899,01         |
| Curva 2  | -53655,95            | -66799,13         | -54875,83         | 75195,47          | 9474,77           | -31885,01         |
| Curva 3  | 150248,05            | -51637,13         | -46694,83         | 3341,47           | 51093,77          | -31999,01         |
| Variância  | $1,04 \cdot 10^{10}$ | $5,75 \cdot 10^7$ | $1,89 \cdot 10^9$ | $5,40 \cdot 10^9$ | $3,89 \cdot 10^9$ | $3,87 \cdot 10^3$ |
| $\Sigma s^2 = 2,16 \cdot 10^{10}$                            |                      |                   |                   |                   |                   |                   |
| <b>C calculado = 0,4808; C tabelado (6, 2, 95%) = 0,6161</b> |                      |                   |                   |                   |                   |                   |

O coeficiente de correlação (R) é obtido a partir da raiz quadrada do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Neste estudo, foi observado um valor de 0,9979 para o valor de  $R^2$ , o que indica uma baixa dispersão do conjunto de pontos experimentais obtidos e uma incerteza menor para os valores dos coeficientes de regressão encontrados, já que o valor de R está bem próximo de 1,000. Desta maneira, o valor de R é utilizado, segundo o Inmetro (2011), para indicar o quanto a reta é adequada como modelo matemático para o estudo do (15E)-licopeno na matriz de tomate. Esta análise só é válida para o ajuste linear e representa a correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo (RIBANI et al, 2004).

Ainda como alternativa, o Inmetro propõe a avaliação da linearidade a partir da análise de variância (ANOVA). Estes resultados, obtidos com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007, podem ser observados na tabela 12.



Tabela 12 – Análise de variância para áreas das soluções padrão

| ANOVA     |                         |                      |                       |          |
|-----------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------|
|           | Graus de liberdade (GL) | Soma Quadrática (SQ) | Média Quadrática (MQ) | Teste F  |
| Regressão | 1                       | $3,74.10^{13}$       | $3,74.10^{13}$        | 7595,943 |
| Resíduo   | 16                      | $7,88.10^{10}$       | $4,93.10^9$           |          |
| Total     | 17                      | $3,75.10^{13}$       |                       |          |

Realizou-se o teste F de significância da regressão que consistiu na comparação dos valores obtidos a partir da razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos,  $MQ_R/MQ_r$  (7595,943) e do ponto de distribuição F com 1 e 16 graus de liberdade, no nível de 95% de confiança, cujo valor é 4,49. Observou-se que a regressão é altamente significativa, pois o valor da razão  $MQ_R/MQ_r$  é muito maior que o valor de  $F_{\text{tabelado}}(1, 16, 95\%)$ . A literatura descreve a utilização da regressão quando  $MQ_R$  é pelo menos cinco vezes maior que  $MQ_r$  (PIMENTEL; BARROS, 1996), já que quanto maior o valor da razão  $MQ_R/MQ_r$  mais significativa é a relação entre as variáveis x e y. Após a comprovação da linearidade para a equação da regressão linear obtida na faixa de trabalho da solução A a F, e com a determinação dos demais parâmetros de validação do método, a curva analítica foi considerada apropriada para a avaliação da concentração do (15E)-licopeno na matriz de estudo.

#### 4.2.5 Limites de detecção e quantificação e faixa linear de trabalho

O LD do método representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011).

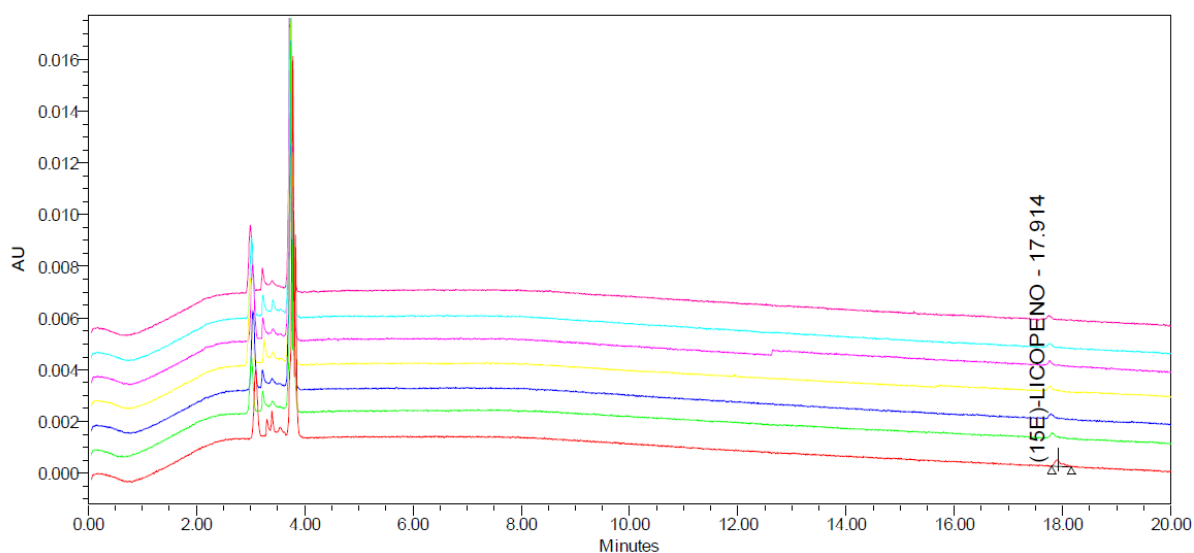
Para a determinação do LD e LQ foi utilizado o método da relação sinal-ruído. Segundo o INMETRO (2011), é importante fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. Enquanto que o LQ é o menor ponto da faixa de trabalho linear determinada.

A determinação do ruído foi realizada por meio da inspeção visual da maior variação de sinal isenta de analito. Para tal, foi empregado o método cromatográfico proposto, com uma solução em branco, apenas constituída de acetona grau cromatográfico.

Desta forma, realizaram-se diluições a da ST de menor concentração, de forma a obter cromatogramas do (15*E*)-licopeno com valores de sinal desejáveis, ou seja, com alturas em torno de três vezes o valor da variação do ruído.

Para o LD foi encontrado o valor de  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  e o LQ definido foi de  $340 \text{ ng.mL}^{-1}$ , o menor nível da curva analítica. A Figura 33 exibe os cromatogramas referentes ao LD.

Figura 33 – Cromatogramas sobrepostos obtidos da diluição da solução de trabalho e para determinação do Limite de detecção.



Legenda: Cromatograma sob o método cromatográfico proposto para determinação de (15*E*)-licopeno.

#### 4.2.6 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. Pode ser

avaliada em 3 níveis: precisão intracorrída (repetitividade), intercorrída (precisão intermediária) e interlaboratorial (reprodutibilidade).

A precisão do método analítico foi avaliada a partir dos valores de desvio padrão relativo (DPR) das medidas de áreas obtidas. O INMETRO (2011) não indica uma faixa determinada de valores aceitáveis para DPR. Ribani et al (2004) admitem valores de DPR de até 20% para análises de traços e impurezas.

#### 4.2.6.1 Precisão intracorrída (repetitividade)

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método obtidos com o mesmo analista e mesma instrumentação no mesmo laboratório em um curto período de tempo (Ribani et al., 2004). Também é chamada de precisão intra-ensaio ou intracorrída.

Para sua determinação foram preparadas sete replicatas autênticas, já que este teste difere da precisão instrumental ou repetibilidade de injeções, que avalia a sequência de injeções de uma única amostra, de acordo com Cassiano et al, 2009 e Ribani et al, 2004. Este procedimento é empregado para certificar equipamentos e verificar a qualidade de injeções manuais (CASS; DEGANI, 2001).

Para o teste de repetitividade foram utilizadas as três replicatas verdadeiras preparadas para a construção da curva analítica e foram preparadas mais 4 replicatas autênticas para a solução D com concentração de 1,680 µg/mL de (15E)-licopeno.

A Tabela 13 apresenta as sete determinações realizadas, a média, o DP, o DPR e os valores de G calculados pelo teste de Grubbs.

Tabela 13 – Resultados do teste de repetitividade para a solução D.

| Área 1                         | Área 2  | Área 3 | Área 4   | Área 5  | Área 6  | Área 7  |
|--------------------------------|---------|--------|----------|---------|---------|---------|
| 1023222                        | 900550  | 942169 | 1092592  | 1136782 | 1137229 | 1085242 |
| $G_{cal}$                      | -1,5451 |        |          |         | 0,97959 |         |
| $G_{tabelado(7,95\%)} = 2,020$ |         |        |          |         |         |         |
| Média                          | 1045398 | DP     | 93744,09 | DPR(%)  | 8,967   |         |

Não foram detectados valores dispersos a partir do emprego do teste de Grubbs para os valores suspeitos, já que os valores de  $G_{\text{calculado}}$  são inferiores aos valores de  $G_{\text{tabelado}}$  para 7 determinações no intervalo de 95% de confiança. O DPR encontrado foi inferior a 10%, o que indica a repetitividade do método analítico desenvolvido para análise de amostras do (15*E*)-licopeno.

#### 4.2.7 Exatidão ou tendência

A exatidão de um método avalia o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Contudo, um valor exato ou verdadeiro é obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. Assim, o teste de exatidão expressa uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos, por esse motivo é um parâmetro utilizado para descrever a confiabilidade do método, assim como a precisão (PASCHOAL et al, 2008). A exatidão foi avaliada a partir dos dados da recuperação, no presente trabalho.

#### 4.2.8 Recuperação

A recuperação mede a eficiência de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Esta deve ser realizada adicionando-se o padrão à amostra antes do processo de extração e por este motivo é avaliada durante a etapa de desenvolvimento do método e não deve ser considerada como parâmetro de validação (PASCHOAL et al, 2008).

Assim, a recuperação foi estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades de (15*E*)-licopeno nas seguintes concentrações: 1,72; 1,88 e 2,02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Segundo o INMETRO (2011), este procedimento é limitado já que a substância adicionada não está necessariamente na mesma forma como na matriz. Assim, a

presença de substâncias adicionadas em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação. A recuperação desejável deve estar próxima de 100%. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para o estudo da recuperação.

Tabela 14 – Teste de recuperação

| <b>Identificação</b> | <b>(15E)-licopeno</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
|----------------------|-----------------------|------------------------|
| Solução de trabalho  | 9,23                  |                        |
| Amostra 1            | 1,69                  |                        |
| Amostra 2            | 1,69                  |                        |
| Amostra + 10 µL      | 1,72                  | 100,38                 |
| Amostra + 10 µL      | 1,72                  | 100,31                 |
| Amostra + 100 µL     | 1,88                  | 100,26                 |
| Amostra + 100 µL     | 1,89                  | 100,89                 |
| Amostra + 250 µL     | 2,02                  | 93,62                  |
| Amostra + 250 µL     | 2,03                  | 94,09                  |

A partir destes dados pode-se inferir que o método é exato, pois os percentuais de (15E)-licopeno encontrados estão próximos do valor verdadeiro que é de 100%.

#### **4.3 Determinação da concentração de (15E)-licopeno em diferentes amostras de tomate obtidas de manejos distintos**

O método analítico proposto foi aplicado em às amostras de tomate obtidos de diferentes manejos: tradicional, TOMATEC e, complementarmente, o tratamento orgânico. Algumas amostras tiveram variados ensacamentos.

Para a quantificação do (15E)-licopeno nas diferentes amostras foi empregada a curva analítica obtida a partir das injeções das replicatas autênticas das soluções A a F (Gráfico 5), cujo valor de  $R^2$  é 0,9979 e a equação linear é  $y = 517406x + 21833$ .

Em um trabalho colaborativo com Ferreira (2013), amostras de tomate, provenientes de Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro, foram analisadas sob diferentes manejos, as concentrações de (15E)-licopeno, são exibidas na tabela 15. Os

nomes das amostras foram preservados de acordo com a identificação da pesquisa colaborada, porém, as amostras foram separadas em quatro grupos (I, II, III e IV).

Tabela 15 – Amostras analisadas provenientes do Estado do Rio de Janeiro

| AMOSTRA                   | Licopeno ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | AMOSTRA                            | Licopeno ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) |
|---------------------------|--|------------------------------------|--|
| <b>Grupo I</b>            |  | <b>Grupo II</b>                    |  |
| Trat. tradicional         | 6671,85                                | Tomatec - Estufa - desensacado     | 5217,78                                |
|                           |  | Tomatec - Estufa - desensacado     | 5084,07                                |
|                           |  | Tomatec - Estufa 1 - Glassyne      | 5439,12                                |
| Trat. tradicional         | 6725,97                                | Tomatec - Estufa 1 - Glassyne      | 5798,04                                |
|                           |  | Tomatec - TNT                      | 5689,75                                |
|                           |  | Tomatec - TNT                      | 6235,06                                |
| <b>Grupo III</b>          |  | <b>Grupo IV</b>                    |  |
| Org. - Estufa 2 - S/ saco | 5726,94                                | Tomatec - Trat. Org. - glassyne    | 6217,66                                |
|                           |  | Tomatec - Trat. Org. - glassyne    | 8280,63                                |
| Org. - Estufa 2 - S/ saco | 5130,69                                | Tomatec - Trat. Org. - desensacado | 6528,76                                |
|                           |  | Tomatec - Trat. Org. - desensacado | 7541,96                                |
| Org. - Estufa 2 - Saco    | 6962,13                                | Tomatec - Trat. Org. - Saco pardo  | 5973,95                                |
|                           |  | Tomatec - Trat. Org. - Saco pardo  | 6213,00                                |
| Org. - Estufa 2 - Saco    | 7207,84                                | Tomatec - Trat. org. - TNT         | 5467,30                                |
|                           |  | Tomatec - Trat. org. - TNT         | 4903,16                                |

Legenda: Org: orgânico; Trat. Org.: tratamento orgânico

#### 4.3.1 Comparação entre os grupos de amostras I e II

Ao analisar os teores de (15E)-licopeno nos tomates estudados, observou-se o maior teor da substância para o grupo I: tomate tratamento tradicional, comparado com o grupo II: tomate tratamento TOMATEC.

Foi realizada a análise de variância para os resultados, através do teste F para os dois grupos de resultados, para 95% de confiança, de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16 – Resultado do teste F para comparação entre os grupos I e II

|                   | <b>Grupo I</b> | <b>Grupo II</b>                        |
|-------------------|----------------|--|
| Média             | 6698,91        | 5577,30                                |
| Variância         | 1464,49        | 177131,11                              |
| Observações       | 2              | 6                                      |
| $F_{\text{calc}}$ | 120,95         | $F_{\text{crítico uni-caudal}}$ 230,20 |

Como o valor de F calculado foi menor que o valor de F crítico, então pode-se afirmar que as variâncias são iguais estatisticamente. Desta forma, como o valor de t calculado foi maior que o valor de t crítico, pode-se afirmar que as concentrações para os grupos I e II não são iguais estatisticamente, como mostra a tabela 17.

Tabela 17 – Resultado da análise do teste t para os dados dos grupos I e II

|                    | <b>Grupo I</b> | <b>Grupo II</b>                     |
|--------------------|----------------|-------------------------------------|
| Média              | 6698,909       | 5577,302                            |
| Variância          | 1464,495       | 177131,1                            |
| Observações        | 2              | 6                                   |
| Variância agrupada |                | 147853,3                            |
| $t_{\text{calc}}$  | 3,57           | $t_{\text{crítico bi-caudal}}$ 2,45 |

#### 4.3.2 Comparação entre os grupos de amostras III e IV

Ao analisar os teores de (15E)-licopeno nos tomates estudados, observou-se o maior teor da substância para o grupo III: tomate tratamento orgânico, comparado com o grupo IV: tratamento orgânico TOMATEC. Foi realizada a análise de variância para os resultados através do teste F para os dois grupos de resultados com 95% de confiança. Como o valor de F calculado foi menor que o valor de F crítico, então é afirmado que as variâncias são iguais estatisticamente, como mostra a Tabela 18.

Tabela 18 – Resultado de comparação entre os grupos III e IV

|                   | <b>Grupo III</b> | <b>Grupo IV</b>                      |
|-------------------|------------------|--------------------------------------|
| Média             | 6256,90          | 6390,80                              |
| Variância         | 983615,38        | 1173849,31                           |
| Observações       | 4                | 8                                    |
| $F_{\text{calc}}$ | 1,1934           | $F_{\text{crítico uni-caudal}}$ 8,89 |

Mesmo que o teor de (15E)-licopeno apresente-se numericamente maior para o tratamento do grupo III frente ao Grupo IV, o teste t apresenta um valor calculado foi menor que o valor de t crítico. Assim, pode-se afirmar que as concentrações para os grupos III e IV são iguais estatisticamente, como mostra a Tabela 19.

Tabela 19 – Resultado da análise do teste t para os dados dos grupos III e IV

|                    | <b>Grupo III</b> | <b>Grupo IV</b>                     |
|--------------------|------------------|-------------------------------------|
| Média              | 6256,90          | 6390,80                             |
| Variância          | 983615,38        | 1173849,31                          |
| Observações        | 4                | 8                                   |
| Variância agrupada |                  | 1116779,13                          |
| $t_{\text{calc}}$  | -0,21            | $t_{\text{crítico bi-caudal}}$ 2,23 |

#### 4.3.3 Comparação entre os grupos de amostras II e IV

Ao analisar os teores de (15E)-licopeno nos tomates dos grupos II: TOMATEC e IV: TOMATEC orgânico foram observadas flutuações de teor para os diferentes ensacamentos. O maior valor refere-se ao tratamento TOMATEC orgânico com ensacamento glassyne, enquanto que o menor foi o tratameto TOMATEC orgânico saco TNT. O fator ensacamento pode ter influenciado no teor de (15E)-licopeno no fruto.

#### 4.3.4 Comparação entre os grupos de amostras dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo

Para as amostras analisadas provenientes de diferentes estados observou-se uma concentração de (15E)-Licopeno maior para o cultivo convencional de Ribeirão Preto. Em seguida o cultivo tradicional de Jequitibá e o tratamento orgânico do tipo Tomatec. Embora, este último tratamento apresente muitas vantagens, entre as quais o plantio ecologicamente adequado, com uso de menos defensivos agrícolas, neste



estudo verificou-se uma concentração (15E)-licopeno mais baixa quando utilizado o cultivo TOMATEC, como mostra a Tabela 20.

Tabela 20 – Amostras analisadas provenientes de diferentes Estados ( $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )

| <b>Amostra</b>                                | <b>Concentração</b> |
|---|---------------------|
| cultivar convencional Jequitibá (MG)          | 6169,9              |
| cultivar Tomatec Jequitibá (MG)               | 3357,9              |
| cultivar Tomatec Ribeirão Preto (SP)          | 3711,1              |
| cultivar Orgânico Tomatec Ribeirão Preto (SP) | 5924,6              |
| cultivar convencional Ribeirão Preto (SP)     | 9962,4              |

## CONCLUSÃO

Foi realizada a validação parcial do método de análise proposto por CLAE-DAD. A partir deste, e segundo os parâmetros estatísticos recomendados pelo INMETRO, considera-se possível quantificar o (15*E*)-licopeno na matriz proposta.

Os critérios de desempenho como seletividade, linearidade, precisão e exatidão foram determinados de acordo com o Guia de Orientação sobre validação de métodos analíticos do Inmetro, Resolução DOQ-CGCRE-008, de 04 de julho de 2011.

O método apresentou seletividade e linearidade adequadas ( $r^2 > 0,99$ ) e precisão expressa em termos de desvio padrão relativo inferior a 10%. A exatidão foi avaliada a partir dos ensaios de recuperação. Foram encontrados valores de 93,62 à 100,89% o que indicou eficiência na metodologia de extração e exatidão do método utilizado por CLAE-DAD.

Com a utilização da metodologia proposta foi possível determinar os teores de (15*E*)-licopeno em diferentes amostras de tomate obtidas de diferentes cultivos.

Embora o manejo do sistema TOMATEC explore mais sustentável, este estudo provou que tais condições afetam a concentração de (15*E*)-licopeno em suas amostras. Foram encontrados maiores teores de (15*E*)-licopeno nas amostras de tomate provenientes de cultivos tradicionais e orgânicos. Também foi constatado que o tipo de ensacamento do fruto pode influenciar nos teores de (15*E*)-licopeno produzido, destacando-se o ensacamento com papel glassyne. Desta maneira, pode-se inferir sobre a ação direta da luminosidade no fruto pode ser um fator decisivo para a obtenção de frutos com maiores teores de (15*E*)-licopeno. Os resultados indicam que ainda é necessário desenvolver manejos que garantam maior concentração da substância estudada.

## REFERÊNCIAS

ALUKO, E. R. Functional Foods and Nutraceuticals. Cap 4. Bioactive polyphenols and carotenoids. New York. Ed. Springer. p.62-88. 2012.

BHERING, S. B. *Influência do manejo do solo e da dinâmica da água no sistema de produção do tomate de mesa: subsídios a sustentabilidade agrícola do Noroeste Fluminense*. 211 f. 2007. Tese (Doutorado em Geografia) - Programa de Pós Graduação em Geografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BIRGE, R. B. et al. Transition dipole orientation of linear polyenes: semiempirical models and extrapolation to the infinite chain limit. *The Journal of Physical Chemistry A*. v. 14, n. 103, p. 2251-2255, fev. 1999.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p. 8.23

BRASIL. Lei nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei n. 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 28 dez. 2007. Seção 1, p. 2.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cadastro nacional de produtores orgânicos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/organicos/cadastro-nacional>>. Acesso em: 15 de fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. instrução normativa nº 50, de 5 de novembro de 2009.

BRASIL. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimento para Registro de alimentos e ou novos ingredientes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 03 maio. 1999a. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 03 maio. 1999b. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 03 nov. 1999c. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. *Guia para validação de métodos Analíticos e Bioanalíticos*. RE nº 899, 13 p. 2012.

BRITTON, G.; KHACHIK, F. Carotenoids in Food. In: BRITTON, G; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. *Carotenoids*. 1. ed. Berlin. Ed. Birkhäuser Basel. 2009. p. 45-66.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação*. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Química Nova*, n. 20, p. 219-225, 1997.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. *Natural colorants for food and nutraceutical uses*, 1. ed. Boca Raton. Ed. CRC Press. 2003. 327 p.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2. ed. West Sussex. Ed. John Wiley & Sons. 2002. 520 p.

DUMAS, Y. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the science of food and agriculture*. v. 83, n. 3, p. 369-382, abr. 2003.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. Lycopene powder. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/media/141659/Lycopene-powder>>. Acessado em: 12 jun. 2013.

ESPINOZA, W. *Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco*. 1. ed. Brasília. Ed. Tropical Gráfica. 1991. 301 p.

ESQUINAS-ALCAZAR, J.; VIÑALS, N. Situación taxonômica, domesticación y difusión del tomate. In: NUEZ, Fernando. *El cultivo del tomate*. 1 ed. México. Ed. Mundi-Prensa. 2001. 793 p.

FAO. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 20 out. 2013.

FARR, D. R. Functional foods. *Cancer Letters*. v. 114, n. 1, p. 59-63, 1997.

FERREIRA J. M. et al. *Tomate: sistemas sustentáveis (Santo Antônio de Pádua)*. PESAGRO-RIO. 2012. Disponível em: <<http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/15%20UPP%20Tomate%20Sistemas%20Sustentaveis%20StoAntPadua.pdf>>. Acesso em jun. 2013.

FERREIRA, M. S. T. *Desafios da transição agroecológica e aspectos agrônômicos do tomateiro em Nova Friburgo-RJ*. 42 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Agricultura Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Agricultura Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

GARCIA-VALVERDE, V. et al. Antioxidant bioactive compounds in selected industrial processing and fresh consumption tomato cultivars. *Food and Bioprocess Technology*. v. 6, p. 391-402, 2013.

GOPALAKRISHNAN, T. R. Vegetable Crops - Horticulture Science Series. Cap 5. Solanaceous vegetables, v. 4. New Delhi. New India Publishing Agency. p. 63-102. 2007.

HARVEY, D. *Modern analytical chemistry*. 1. ed. New York. Ed. McGraw-Hill. 1999. 816 p.

HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. *Data analysis for chemistry: An introductory guide for students and laboratories scientists*. New York: Oxford University Press, 2006. 177p.

IBGE. *Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil*. Rio de Janeiro. v. 26, n.7, julho 2013.

INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Carotenoids in Tomato Plants. In: Preedy, Victor R.; Watson, Ronald R. (Org.). *Tomatoes and tomato products: nutritional, medicinal and therapeutic properties*. 1 ed. Enfield: Science Publishers, 2008. Cap. 7, p. 133 – 164.

INMETRO. *Orientações sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo*. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04 – JUL/2011. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Disponível em: <<http://www.iom.edu/Reports/2000/Dietary-Reference-Intakes-for-Vitamin-C-Vitamin-E-Selenium-and-Carotenoids.aspx>>. Acesso em: 06 jan. 2013.

ISHIDA, B. K.; MA J.; CHAN, B. A simple, rapid method for HPLC analysis of lycopene isomers. *Phytochemical Analysis*. v. 3, n. 12, p. 194-198, maio-jun. 2001.

JASWIR, I et al. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*. v.5, n. 33, p. 7119-7131, dec. 2011.

KANJI, G. K. *100 Statistical tests*. 3 ed. Londres: SAGE publication Ltd., 2006. 242p.

LEE, M.T., CHEN, B.H. Separation of Lycopene and its cis isomers by liquid chromatography. *Chromatographia*. n. 54, p. 613–617, nov. 2001.

LEE, M.T., CHEN, B.H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*. v. 78, n. 4, p. 425–432, set. 2002.

LIN, C.H.; CHEN, B.H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. n. 1012, p. 103–109, jun. 2003.

LUCINI, L. et al. Rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. n. 92, p.1297-1303, nov. 2012.

MACEDO, J.R. et al. Recomendações Técnicas para a Produção do Tomate Ecológicamente Cultivado – TOMATEC. *Circular Técnica (Embrapa solos)*. n. 33, p. 1-10, dez. 2005.

MELO, J.M.M.C. Aspectos microbiológicos e informação nutricional de molho de tomate orgânico oriundo da agricultura familiar. *Brazilian Journal of Food Technology*. v. 15, n. esp., p. 18-22, maio 2012.

MEYER, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 357p.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 6ed. England: Pearson education Limited, 2010. 295p.

MURREL, J. H. *Theory of the Electronic Spectra of Organic Molecules*. New York: Wiley and Sons, 1963. 328 p.

OLIVER, J.; PALOU A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*. v. 881, n. 1-2, p. 543–555, jun. 2000.

PACHECO, S. *Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida*. 106 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 5, p. 1190-1198, 2008.

PAVIA, D. L. et al. *Introduction to Spectroscopy*. 4 ed. Belmont. Ed. Cengage Learning. 2008. 752 p.

PIMENTEL, M. F.; BARROS N. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, n. 3, p. 268-277, 1996.

PÓL, J. et al. Determination of lycopene in food by on-line SFE coupled to HPLC using a single monolithic column for trapping and separation. *Journal of Chromatography A*, v. 1-2, n. 1052, p. 25-31, out. 2004.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. v. 3, n. 55, p. 207-216, jan. 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISO, P. et al. Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake: Effects on cellular antioxidant protection. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 10, n. 58, p. 1350-1358, out. 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. 1. ed. Washington, DC. Ed. International Life Sciences Institute. 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2*. 1. ed. Washington, DC. International Center for Tropical Agriculture (CIAT). Ed. International Food Policy Research Institute. 2004. 57 p.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*. n. 16, p. 565-574, mar. 1999.

SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C<sub>30</sub> stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, n. 880, p. 189-202, jun. 2000.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological *application*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 385, n. 1, p. 4-12, jan. 2001.

SALEH, M. H.; TAN, B. Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 8, n. 39, p. 1438-1443, 1991.

SCHIERLE, J. et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chemistry*. v. 59, n. 3, p. 459-465, jul.1997.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E PECUÁRIA. Rio Rural - Desenvolvimento rural sustentável em microbacias hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <[http://www.microbacias.rj.gov.br/programa\\_rio\\_rural.jsp](http://www.microbacias.rj.gov.br/programa_rio_rural.jsp)>. Acesso em: maio 2013.

SILVA, D. J. H. da et al. Tomatoes: Origin, Cultivation Techniques and Germplasm Resources. In: Preedy, Victor R.; Watson, Ronald R. (Org.). *Tomatoes and tomato products: nutritional, medicinal and therapeutic properties*. 1 ed. Enfield: Science Publishers, 2008. Cap. 1, p. 3 – 25.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5 ed. Porto Alegre. Ed. Bookman. 2002. 835 p.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*. v. 62, p. 1315S-1321S, dez. 1995. Suplemento.

STAHL, W. et al. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 3, n. 71, p. 795-798, mar 2000.

STAHL, W. et al. Separation of  $\beta$ -carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clinical Chemistry*. v. 5, n. 39, p. 810-814, maio 1993.

STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *The journal of nutrition*. v. 11, n.122, p. 2161-2166, nov. 1992.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*. v. 4, n. 54, p. 733-749, maio 2008.

TONHI, E. COLLINS, K. E. JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, v. 4, p. 616-623, 2002.



TÔSTO, S. G. et al. Avaliação de impacto ambiental - produção de tomate de mesa ecologicamente cultivado no município de São José de Ubá, RJ - uma aplicação do método Ambitec-Agro. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa solos)*. 1 ed. Rio de Janeiro, [s.n.], 2006. 35 p.

WILDMAN, R. E. C. Handbook of nutraceuticals and functional foods. 1. ed. 2000. CRC press. Boca Raton. 568 p.

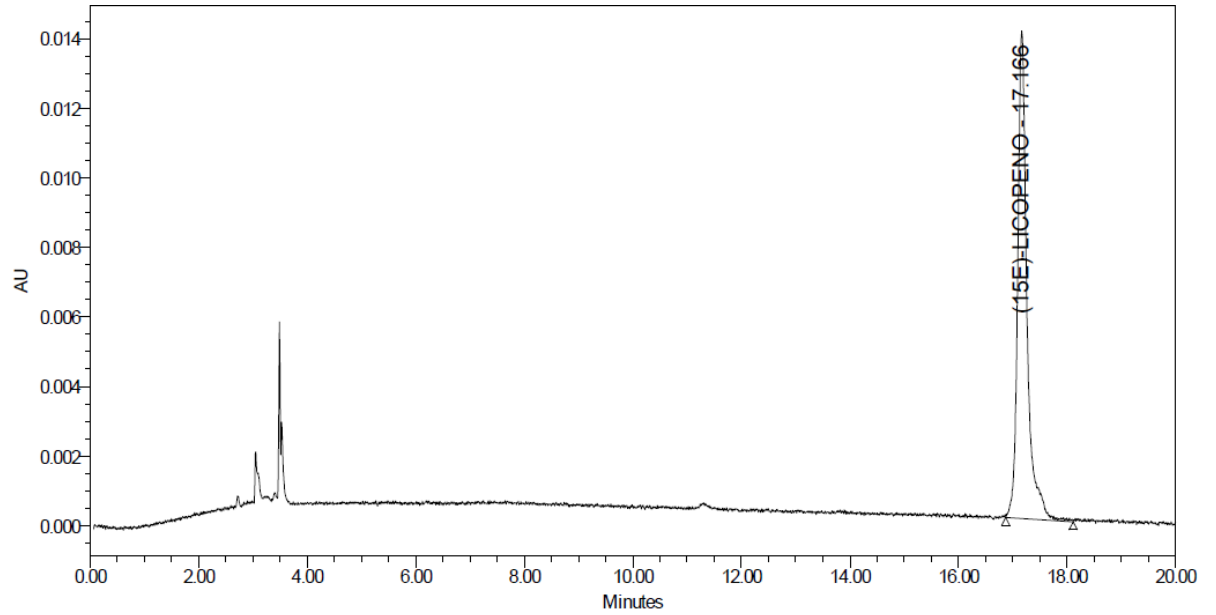
WINDHOLZ, M. (Ed.) et al. *The Merck index: An encyclopedia of chemicals and drugs*. 9. ed. Rahway. Ed. Merck & CO. 1976. 1313 p.

YEUM, K. et al. Human plasma carotenoid response to ingestion controlled diets high in fruits and vegetables. *The American journal of clinical nutrition*. v.4, n. 64, p. 594-602. 1996.

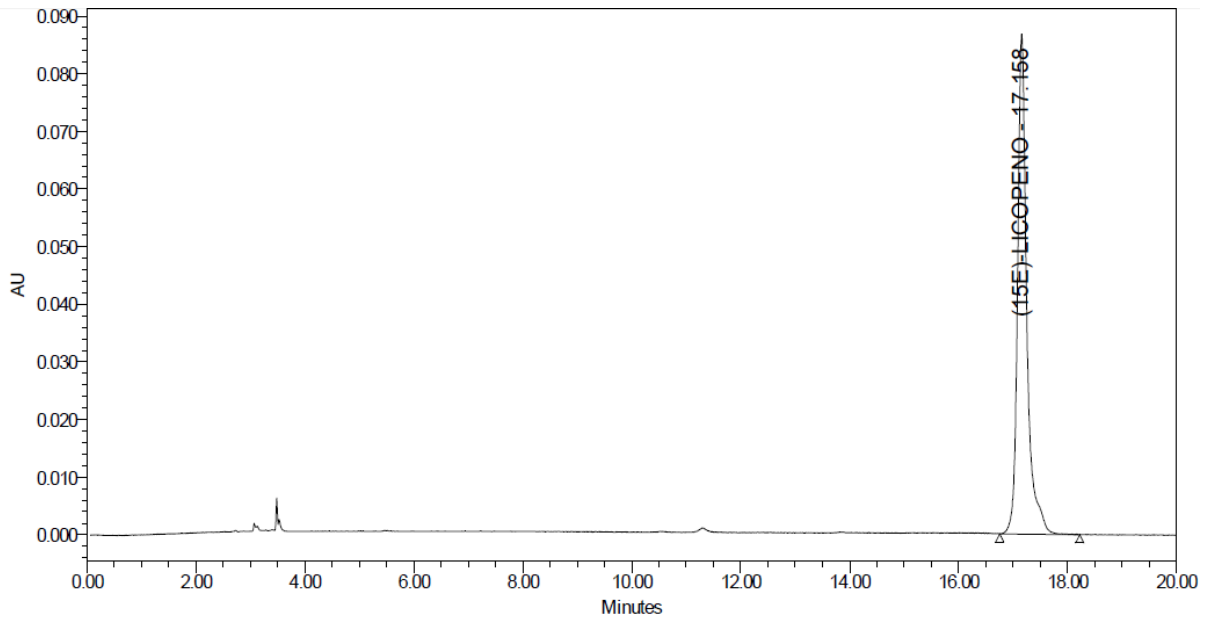
ZACARIA, M. et al. Use of reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *Journal of chromatography*. v.1, n. 176, p. 109-117. 1979.

ZECHMEISTER, L. et al. Spectral characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including prolycopene and pro- $\gamma$ -carotene. *Journal of American Chemical Society*, n. 65, p. 1940-1951. 1943.

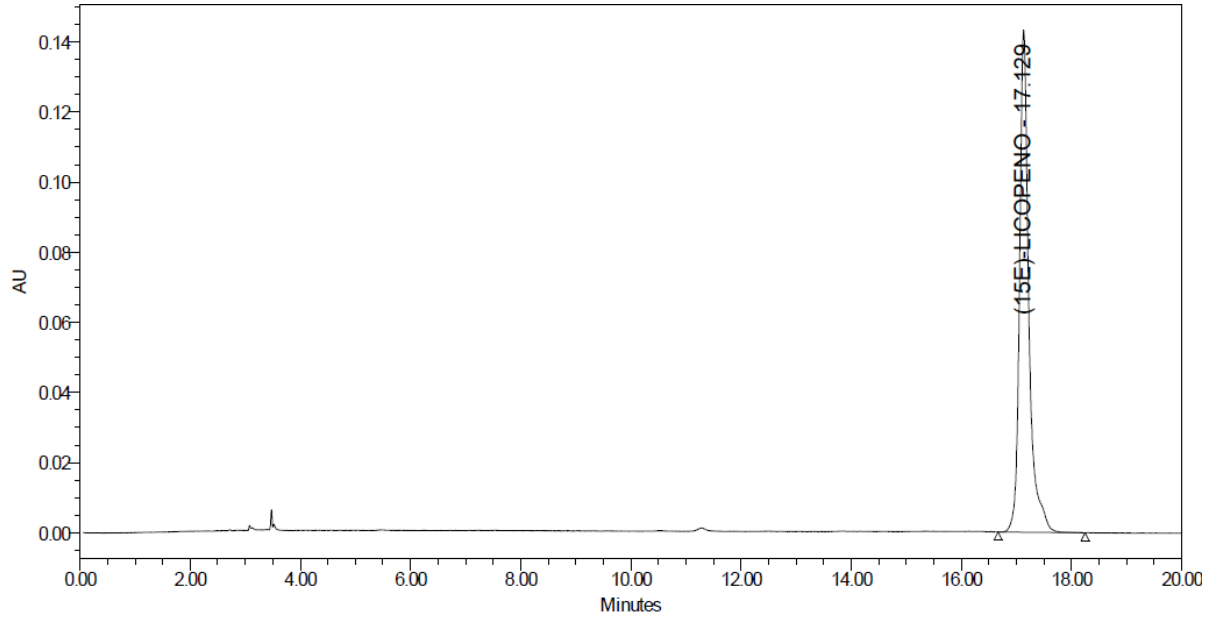
## APÊNDICE A – Cromatogramas relativos à curva analítica número 1



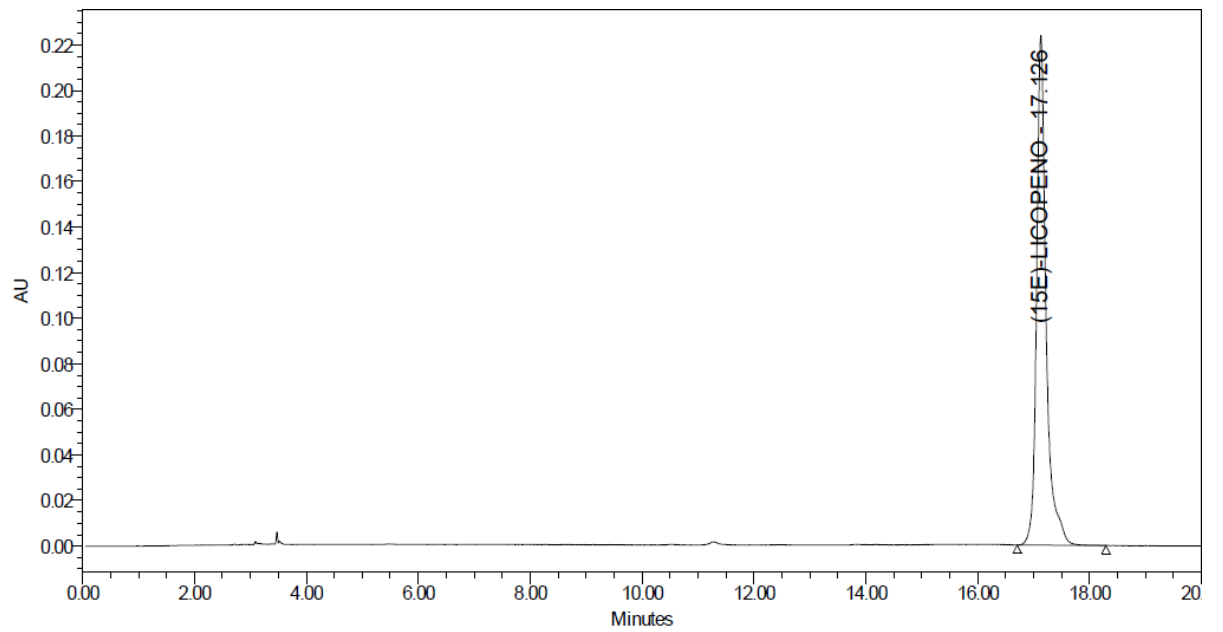
|   | Channel              | PeakName       | RT     | Area   | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|--------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.166 | 165866 | 100.00 |



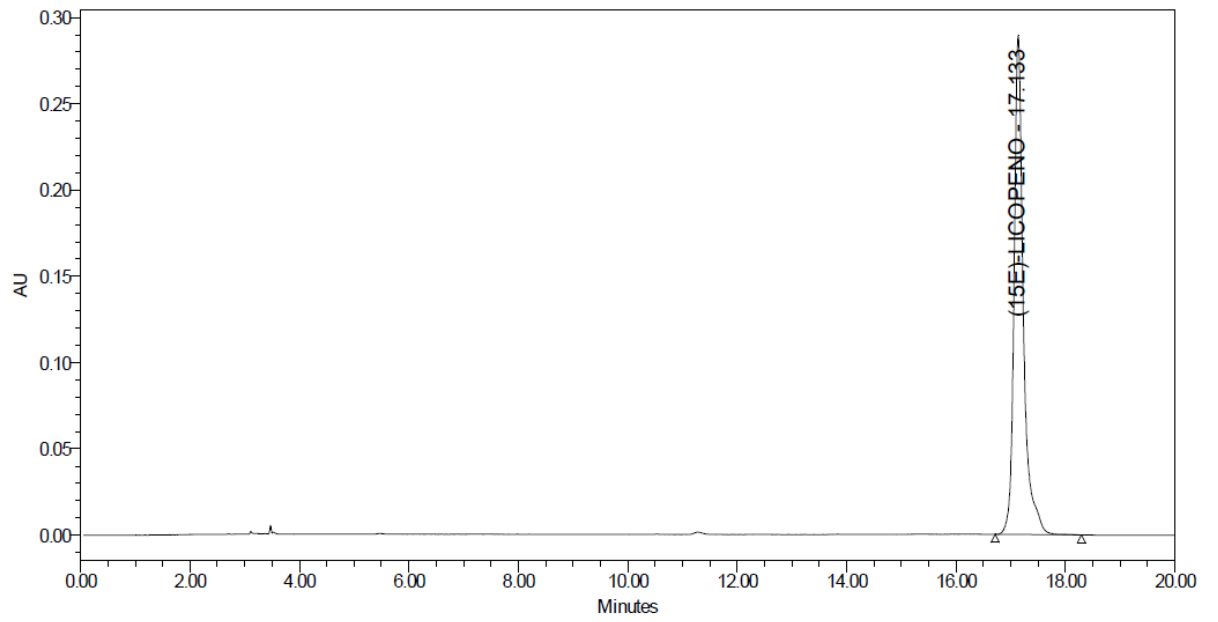
|   | Channel              | PeakName       | RT     | Area    | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|---------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.158 | 1023222 | 100.00 |



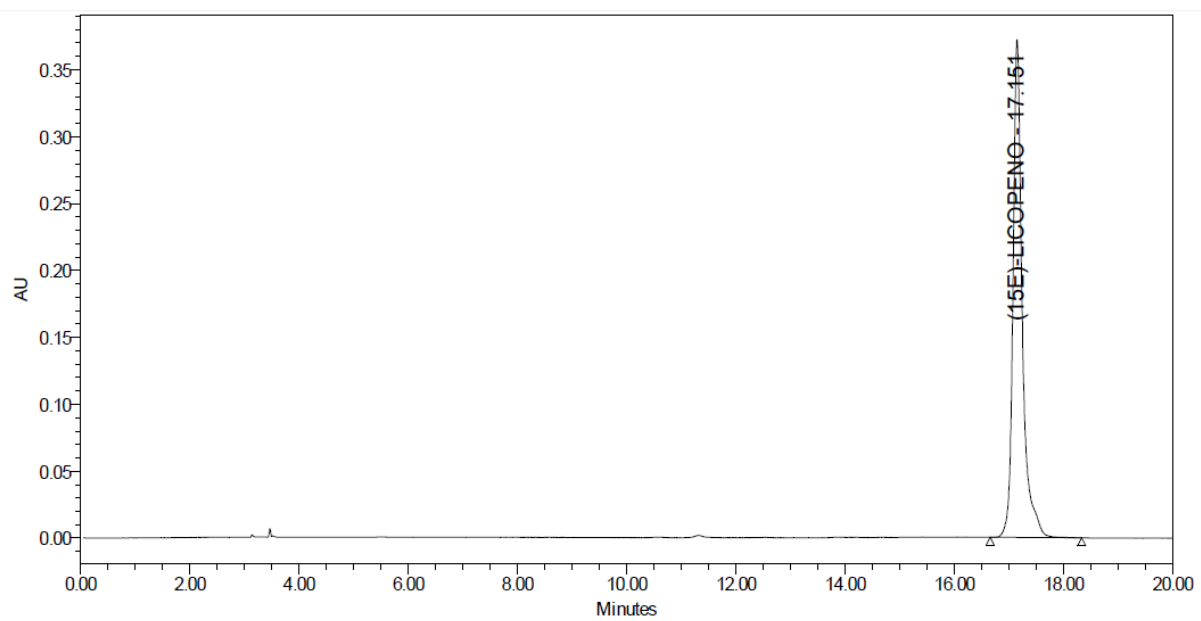
|   | Channel              | PeakName       | RT     | Area    | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|---------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.129 | 1688541 | 100.00 |



|   | Channel              | PeakName       | RT     | Area    | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|---------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.126 | 2653688 | 100.00 |



|   | Channel              | PeakName       | RT     | Area    | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|---------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.133 | 3440008 | 100.00 |



|   | Channel              | Peak Name      | RT     | Area    | % Area |
|---|----------------------|----------------|--------|---------|--------|
| 1 | 2998 Ch1 470nm@1.2nm | (15E)-LICOPENO | 17.151 | 4419535 | 100.00 |

Apêndice B – Cromatogramas relativos às amostras

