

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Mariana Toledo Clemente Campos

Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate

Juiz de Fora

2020

Mariana Toledo Clemente Campos

Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Coorientadora: Dra. Lenize Fernandes Maia

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Mariana Toledo Clemente.

Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate / Mariana Toledo Clemente Campos. -- 2020.

62 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Coorientadora: Lenize Fernandes Maia

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Espectroscopia Raman. 2. Carotenos. 3. Fitoeno. 4. Fitoflueno. 5. Tomate. I. Oliveira, Luiz Fernando Cappa de, orient. II. Maia, Lenize Fernandes, coorient. III. Título.

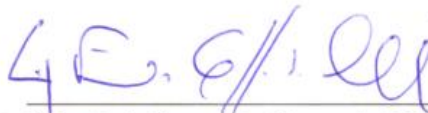
Mariana Toledo Clemente Campos

Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em 13 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Lenize Fernandes Maia – Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Mariana Ramos de Almeida

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho à minha mãe, meu pai (*in memoriam*) e àqueles que sempre estiveram presentes, inspirando-me e auxiliando...

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui, foi um longo caminho. Por vezes pensei que não era capaz, que não conseguiria e talvez não conseguisse mesmo se não tivesse pessoas tão especiais em minha vida.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, por me darem a vida, educação e valores. Mãe, sem seu apoio e esforço eu não teria chegado até aqui, meu eterno amor a você. Pai (*in memoriam*), onde quer que esteja, sei que sempre estará ao meu lado, me protegendo e amando.

Ao meu namorado, José Rodolfo, obrigada por estar ao meu lado, me incentivando, me amando e por toda paciência. Também agradeço a todos familiares que contribuíram de alguma forma para eu chegar até aqui.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, e a minha co-orientadora, Dra. Lenize Fernandes Maia, por todo apoio, confiança e conhecimento transmitido. Obrigada, vocês são meus exemplos de profissionais.

Aos meus amigos de faculdade, alguns estão comigo desde o início do curso de Química, obrigada por tornarem a caminhada mais leve e alegre. Aos amigos do NEEM, obrigada pela companhia e diversos cafés compartilhados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química, obrigada por toda solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades. Agradeço também aos professores Dr. Ademar Alves da Silva Filho, Dr. Antônio Carlos Sant'Ana e Dra. Mariana Ramos de Almeida, membros da banca de Qualificação e Defesa de Mestrado, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço as agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento que possibilitou a realização desse projeto e a Universidade Federal de Juiz de Fora, onde cursei toda minha graduação e mestrado.

Por fim, agradeço a Deus e Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, me iluminando, guiando e me sustentando até aqui. Obrigada por tudo que tenho e que sou.

RESUMO

Neste estudo, a espectroscopia Raman foi utilizada para caracterização dos carotenoides presentes nos diferentes estágios de maturação do tomate (*Lycopersicon esculentum*) e dos precursores fitoeno e fitoflueno, ainda não descritos na literatura. A análise das fases de maturação foi feita diretamente no exocarpo, sem qualquer preparação prévia da amostra. Os espectros Raman das amostras *in situ* sugeriram a presença de moléculas contendo 7, 9 e 11 insaturações ao longo do processo de maturação. O número de ligações duplas conjugadas foi correlacionado com os números de onda referentes às vibrações de estiramento C=C. As análises espectrais mostraram variações na composição e distribuição dos carotenoides ao longo do processo de maturação. A distribuição dos carotenoides na superfície (exocarpo) do tomate não é homogênea e apresenta alternância de pigmentos independente do estágio de maturação. Com o objetivo de isolar e identificar por espectroscopia Raman os carotenos presentes no tomate extrações do exocarpo foram feitas através de diferentes metodologias utilizando etanol, acetona e éter de petróleo como solventes. A purificação do extrato etéreo foi feita em coluna aberta utilizando-se Hyflosupercel e óxido de magnésio (2:1) como fase estacionária. Os eluentes utilizados foram éter etílico em éter de petróleo e acetona em éter de petróleo. A caracterização espectroscópica das frações obtidas da coluna foi realizada em equipamento FT-Raman e em um espectrofotômetro de UV/Vis na região entre 200 a 1100 nm. Os resultados obtidos através das espectroscopias sugeriram a presença dos carotenos fitoeno e fitoflueno nas frações F1 e F2, respectivamente, o β -caroteno na fração F5 e o licopeno em mistura com o neurosporeno na fração F10. Para a atribuição inequívoca das bandas Raman dos carotenos incolores foram realizadas análises comparativas entre o espectro do *cis/trans*-fitoeno padrão e espectros obtidos através de cálculos de frequência vibracional pelo método DFT. Os resultados mostraram que as espectroscopias Raman associada ao UV-Vis são adequadas para caracterizar os principais carotenos biossintetizados durante o processo de maturação.

Palavras-chave: Carotenos. Espectroscopia Raman. Fitoeno. Fitoflueno.

ABSTRACT

In this study, we used Raman spectroscopy to characterize carotenoids composition during tomato (*Lycopersicon esculentum*) ripening and to identify the biosynthetic precursors phytoene and phytofluene. The analysis of maturity stages was carried out directly on the exocarp, without any prior preparation of the sample. The Raman spectra recorded *in situ* suggested the presence of molecules containing 7, 9 and 11 conjugated double bonds along the maturation process. The number of conjugated double bonds was correlated with the wavenumbers referring to the stretch vibrations C=C. Spectral analyzes also showed variations in the composition and distribution of carotenoids throughout the maturation process. The distribution of carotenoids on the surface (exocarp) of the tomato is not homogeneous and presents alternation of pigments regardless of the stage of maturation. In order to isolate and identify by Raman spectroscopy the carotenes produced during the maturation process we performed extraction of the exocarp by different methodologies using ethanol, acetone and petroleum ether as solvents. The petroleum ether extract was purified in an open column using Hyflosupercel and magnesium oxide (2:1) as a stationary phase. The eluents used were ethyl ether in petroleum ether and acetone in petroleum ether. The spectroscopic characterization of the fractions obtained from the open column was performed on an FT-Raman and on a UV / Vis spectrophotometer in the region between 200 to 1100 nm. The results obtained from the spectroscopic techniques indicated the presence of carotenes phytoene and phytofluene in fractions F1 and F2, respectively, β -carotene in fraction F5 and lycopene in mixture with neurosporene in fraction F10. The unambiguous attribution of the Raman bands obtained from colorless carotenes was performed by comparison of spectral data from the standard sample *cis/trans*-phytoene and spectra obtained from vibrational frequency calculations using the DFT method. The results showed that Raman spectroscopies associated with UV-Vis are suitable to characterize the main carotenes biosynthesized during the maturation process.

Keywords: Carotenes. Raman spectroscopy. Phytoene. Phytofluene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas: (a) 15Z- fitoeno e (b) 15Z- fitoflueno.....	14
Figura 2 - Rota biossintética simplificada até o β - caroteno e o α - caroteno.	15
Figura 3 - Estágios de maturação do tomate.	17
Figura 4 - Modos de espalhamento presentes no efeito Raman.	21
Figura 5 - Grupo de amostras GA-A: verde (E1), após 7 (E4) e 11 (E5) dia.....	26
Figura 6 - Grupo de amostras GA-B: 1) GA-B1, 2) GA-B2, 3) GA-B3.....	27
Figura 7 - Grupo de amostras GA-C.	27
Figura 8 - Espectros Raman das peles de tomates, (GA-A), obtidos com laser operando em 1064 nm.....	33
Figura 9 - Espectros Raman das peles de tomates (GA-B1), obtidos com <i>laser</i> operando em 1064 nm.....	35
Figura 10 - Espectros Raman das peles de tomates (GA-B2), obtidos com <i>laser</i> operando em 1064 nm.....	37
Figura 11 - Espectros Raman das peles de tomates (GA-B3), obtidos com laser operando em 1064 nm.....	38
Figura 12 - Espectros Raman das peles de tomates (GA-C), obtidos com <i>laser</i> operando em 1064 nm.....	40
Figura 13 - Espectros Raman das peles de tomates (GA-C), obtidos com laser operando em 785 nm.....	42
Figura 14 - Espectros Raman dos extratos EtOH-1 e EtOH- 2, obtidos com <i>laser</i> operando em 1064 nm.....	43
Figura 15 - Espectros Raman dos extratos etanólico (EtOH- 2), acetônico (Ac) e após partição com éter de petróleo (EP), obtidos com <i>laser</i> operando em 1064 nm.	44
Figura 16 - Espectros eletrônicos das frações obtidas através do extrato etéreo (E3, E4 e E5) cromatografado em coluna aberta.	47
Figura 17 - Espectros Raman das frações obtidas através do extrato etéreo (E3, E4 e E5) cromatografado em coluna aberta, com laser operando em 1064 nm.....	48
Figura 18 - Espectros Raman do padrão de <i>cis/trans</i> - fitoeno, teórico e da fração F1, na região de 1800 a 800 cm^{-1}	50
Figura 19 - Estrutura química otimizada do fitoeno.....	51
Figura 20 - Espectros Raman teórico do fitoflueno e da fração F2, na região de 1800 a 800 cm^{-1}	52

Figura 21 - Estrutura química otimizado do fitoflueno.	53
---	----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Análises espectroscópicas dos grupos de amostras (GA) de tomates.....	25
Fluxograma 2 - Preparação do extrato acetônico, etéreo e purificação dos carotenos.....	30
Fluxograma 3 - Análises espectroscópicas dos extratos, frações e do padrão de cis/trans- fitoeno.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-A).....	34
Tabela 2 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B1).....	36
Tabela 3 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B2).....	37
Tabela 4 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B3).....	39
Tabela 5 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-C).....	40
Tabela 6 - Comprimentos de onda (nm) de absorção de carotenos em éter de petróleo.....	46
Tabela 7 - Principais bandas Raman (cm^{-1}) e comprimento de onda de máxima absorção das frações analisadas.	49
Tabela 8 - Tentativa de atribuição das bandas Raman do espectro teórico, do padrão de cis/trans- fitoeno e da fração F1 (cm^{-1}).....	51
Tabela 9 - Tentativa de atribuição das bandas Raman do espectro teórico do fitoflueno e da fração F2 (cm^{-1}).	53
Tabela 10 - Correlação entre do número de ligações duplas conjugadas de polienos com a posição da banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ (cm^{-1}).....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	TOMATE COMO FONTE DE CAROTENOIDES.....	17
1.2	ESPECTROSCOPIA RAMAN	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	24
3.2	METODOLOGIA TEÓRICA	24
3.3	ESPECTROSCOPIA RAMAN NO MODO <i>IN SITU</i> APLICADA À CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DO TOMATE	25
3.3.1	Análises espectroscópicas do grupo de amostras A (GA-A)	25
3.3.2	Análises espectroscópicas do grupo de amostras B (GA-B).....	26
3.3.3	Análises espectroscópicas do grupo de amostras C (GA-C).....	27
3.4	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	28
3.4.1	Extração com etanol	28
3.4.2	Extração com acetona e partição com éter de petróleo.....	28
3.5	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CAROTENOS	29
3.6	ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA À ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS.....	30
3.7	ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	30
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	32
4.1	ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS PELES DOS TOMATES NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO	32
4.2	ANÁLISE DOS EXTRATOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	43
4.3	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA	45

4.4	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS CAROTENOS FITOENO E FITOFLUENO.....	49
4.4.1	Fitoeno.....	49
4.4.2	Fitoflueno.....	52
5	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APENDICE A- Súmula curricular.....	61
	ANEXO A – Relação do número de ligações conjugadas com o $\nu(\text{C}=\text{C})$	62

1 INTRODUÇÃO

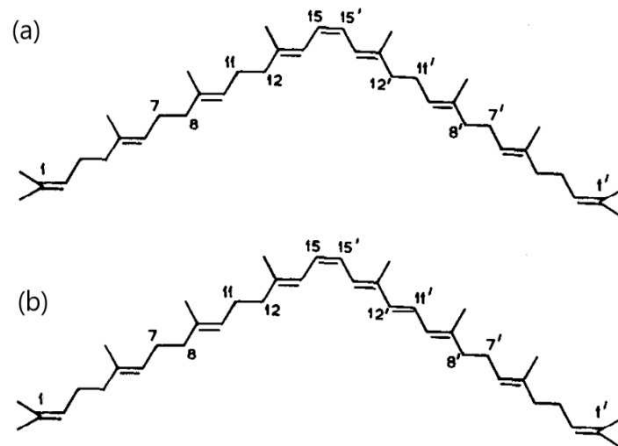
Carotenoides são substâncias orgânicas pertencentes à família dos tetraterpenos e são comumente divididos em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas (RODRIGUEZ – AMAYA, 2001). Os carotenos são hidrocarbonetos lineares ou ciclizados, como licopeno, α -caroteno e β -caroteno. Já as xantofilas são os derivados oxigenados (grupos epóxi, hidroxil, metoxil, aldeídicos, cetônicos e carboxílicos) de carotenos, como por exemplo, luteína e zeaxantina. São conhecidos por serem pigmentos naturais (amarelos, alaranjados e vermelhos) importantes que conferem coloração a vários organismos. Apresentam funções fisiológicas e ecológicas diversas, tais como transferência e captação de energia no metabolismo primário, precursores de fito-hormônios, proteção contra foto-oxidação, sinalização sexual e defesa química (CAZZONELLI, 2011).

Os carotenoides podem ser encontrados nos mais diversos sistemas, tais como em vegetais (legumes, frutas, verduras, etc.) (RODRIGUEZ – AMAYA, 2001), animais, fungos e microrganismos (LIAAEN-JENSEN, 1985, 1991; ROMERO *et al.*, 2012.)

Carotenoides apresentam diversas atividades biológicas tais como, antioxidantes (POLYAKOV *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2003), anti-inflamatórios (PAIVA; RUSSEL, 1999; PINI *et al.*, 2004) e anticancerígenos (PAIVA; RUSSEL, 1999; STRADI; BERTELLI; PINI, 2005). Devido a sua capacidade aceptora de elétrons, estudos teóricos já evidenciaram a capacidade de ação contra os radicais livres (MARTINEZ *et al.*, 2008; MARTINEZ, 2009). Moléculas que possuem essa propriedade podem atuar como capturadores de elétrons livres e, como resultado, prevenir contra o estresse oxidativo (MARTINEZ *et al.*, 2008; MARTINEZ, 2009). Consequentemente, entre as funções mais investigadas dessa classe de moléculas está a função de proteção dos seres vivos contra espécies reativas de oxigênio (LESSER, 2006; MORELLI *et al.*, 2003).

Dentre os carotenoides, dois são considerados diferenciados por serem incolores, o fitoeno e fitoflueno (Fig. 1), e ambos são precursores desta classe de substâncias (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015). Fitoeno e fitoflueno são alcenos, com nove e dez ligações duplas, respectivamente. No fitoeno, três ligações duplas são conjugadas, enquanto que no fitoflueno são cinco.

Figura 1- Estruturas químicas: (a) 15Z- fitoeno e (b) 15Z- fitoflueno.



Fonte: Adaptado de IUPAC (1972).

A biossíntese de carotenoides é realizada por todos os organismos fotossintéticos e por algumas bactérias e fungos não fotossintéticos, já os animais apenas acumulam e/ou convertem precursores ingeridos através de alimentos que o contêm. Em plantas, a formação enzimática de carotenoides ocorre nos plastídios e é mediada por enzimas codificadas nuclearmente. A via se inicia com a condensação do difosfato de geranylgeranila (GGPP- Geranylgeranyl pyrophosphate), o qual é precursor biossintético de vários terpenos. Após a condensação de duas moléculas de GGPP, o 15Z- fitoeno é formado como o principal isômero na maioria dos organismos carotenogênicos, através de uma reação catalisada pela enzima fitoeno sintase (PSY). O fitoflueno é formado pela ação da fitoeno dessaturase (PDS), que inserem uma dupla ligação, prolongando o sistema de duplas ligações conjugadas passando de três para cinco insaturações (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015; SHUMSKAYA, WURTZEL, 2013). A figura 2 mostra a rota biossintética simplificada do difosfato de geranylgeranila até o β - caroteno e o α - caroteno.

Figura 2- Rota biossintética simplificada até o β - caroteno e o α - caroteno.



Fonte: Adaptado de Shumskaya, Wurtzel (2013).

A cadeia carbônica alifática insaturada conjugada, contendo elétrons π altamente polarizáveis, faz com que os carotenoides sejam reativos ao interagir com espécies “ativadas” de oxigênio, tais como radicais superóxidos, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radicais hidroxilas (LESSER, 2006). A ação antioxidante dos carotenoides está relacionada, principalmente, com a sua capacidade de sequestrar oxigênio singlete e capturar radical peroxila. A variação na reatividade dos diferentes tipos de carotenoides com o oxigênio singlete está relacionada, prioritariamente, ao número de ligações duplas conjugadas e, em menor grau de importância, ao tipo de grupos substituintes nas posições terminais da molécula (MORTENSEN; SKIBSTED; TRUSCOTT, 2001; PAIVA; RUSSEL, 1999).

O licopeno, com 11 ligações duplas conjugadas, constitui um dos exemplos, apresenta maior eficiência como antioxidante, quando comparado com o β -caroteno (9 ligações duplas conjugadas) e tocoferol (KONG *et al.*, 2010). Apesar disso, há estudos que compararam a ação antioxidante do licopeno com o fitoeno e fitoflueno e embora ambos não sejam anti-radicais livres tão eficazes quanto o licopeno, eles apresentam capacidade antioxidante considerável, apesar do pequeno número de duplas ligações conjugadas (CAMPBELL *et al.*, 2007; MARTÍNEZ; STINCO; MELENDEZ-MARTÍNEZ, 2014). Há estudos apontando que os carotenoides incolores, fitoeno e fitoflueno, podem estar envolvidos, separadamente ou em conjunto com outros componentes alimentares, em ações biológicas que poderiam fornecer benefícios a saúde. Em um desses estudos os autores investigaram os possíveis benefícios do fitoeno e fitoflueno no câncer de próstata, e observou-se que o fitoflueno reduziu o crescimento de células cancerígenas (KOTAKE-NARA *et al.*, 2001). Em um outro estudo, onde ratos com um tipo de câncer de próstata foram alimentados com tomate em pó (contendo fitoeno, fitoflueno e outros compostos, além do licopeno) e licopeno puro, mostrou-se que o consumo de tomate em pó, mas não o licopeno, inibiu a carcinogênese da próstata, sugerindo que o tomate possui outras substâncias e carotenos além do licopeno que modificam a carcinogênese de próstata (BOILEAU *et al.*, 2004).

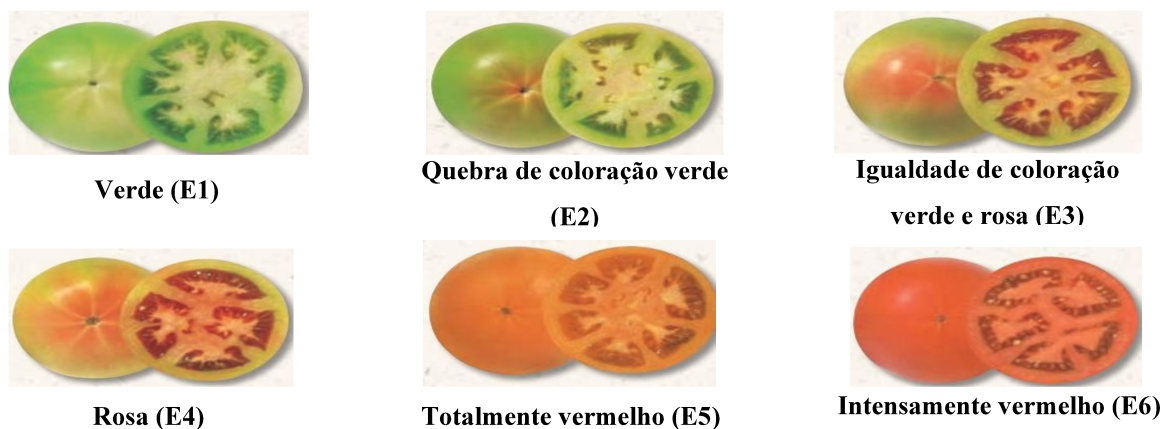
Apesar da importância desses dois carotenos, fitoeno e fitoflueno, até o momento, não há estudos que caracterizam suas estruturas através da espectroscopia Raman. A espectroscopia Raman é uma das técnicas mais utilizadas para a investigação das características vibracionais das moléculas, e em particular de polienos conjugados como os carotenos (FERREIRA *et al.*, 2013; MAIA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os espectros vibracionais dos polienos obtidos por meio da espectroscopia Raman apresentam perfis característicos com bandas em regiões específicas do espectro vibracional. Suas principais bandas encontram-se em torno de $1500-1550\text{ cm}^{-1}$ e em $1150-1170\text{ cm}^{-1}$ devido a vibrações de estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}-\text{C})$, respectivamente (MAIA; OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2017). As metilas que caracterizam

unidades isoprênicas fornecem bandas adicionais na região de 1000-1020 cm^{-1} , que são referentes ao modo vibracional de deformação do grupo CH_3 $\rho(\text{C}-\text{CH}_3)$ ligado ao polieno (SCHULZ; BARANSKA, 2007).

1.1 TOMATE COMO FONTE DE CAROTENOIDES

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma das frutas mais consumidas na dieta humana, e apresenta uma grande variedade de carotenoides tais como licopeno, neoxantina, violaxantina, α -criptoxantina, zeaxantina, luteína, β -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno, ciclicopeno, neurosporeno, β -caroteno 5,6-epóxido, e os precursores fitoeno e fitoflueno (FRASER *et al.*, 1994; PERVEEN *et al.*, 2013). Entretanto, a concentração de cada carotenoide em diferentes partes do fruto é dependente da fase de maturação. Durante o amadurecimento, algumas mudanças são perceptíveis a olho nu, como a alteração da cor do fruto. Há seis estágios bem estabelecidos de maturação de acordo com a cor da superfície: tomate verde (E1), com quebra de coloração verde (E2), igualdade de coloração verde e rosa (E3), rosa (E4), totalmente vermelho (E5) e intensamente vermelho (E6) (LAGORIO, 2013).

Figura 3- Estágios de maturação do tomate.



Fonte: Adaptado de Lagorio (2013).

A variação da cor está relacionada com a concentração de carotenoides, mais especificamente do licopeno (ARIAS *et al.*, 2000; HARA *et al.*, 2018), mas cabe ressaltar que outros metabólitos como clorofila, polifenóis e alcaloides também estão presentes em diferentes concentrações durante os estágios de maturação (KOZUKUE *et al.*, 2003; TAMASI *et al.*, 2019).

Apesar da avaliação da maturação do tomate com base na classificação de cores, realizada pela técnica de observação visual, seja uma abordagem útil, não é a mais precisa, pois a maturação dos frutos implica em uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas complexas como, por exemplo, síntese de carotenoides e a degradação da clorofila / amido (MARTIN *et al.*, 2016). Nesse sentido, a espectroscopia Raman tem sido utilizada para distinguir entre diferentes tipos de carotenoides presentes nos seis diferentes estágios de maturação do tomate, de acordo com os números de onda referentes a duas bandas principais, já citadas, que ocorrem na faixa entre 1570-1500 cm^{-1} devido ao modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{C})$ e na faixa entre 1170-1150 cm^{-1} ao modo $\nu(\text{C}-\text{C})$ (HARA *et al.*, 2018; SCHULZ; BARANSKA; BARANSKI, 2005).

A figura 2 mostra a rota biossintética que converte fitoeno em outros carotenoides. Como pode ser observado ocorre um aumento progressivo do número de insaturações conjugadas. Em um estudo sobre a relação entre extensão da conjugação de polienos com o espalhamento Raman, verificou-se que um polieno com três e cinco ligações duplas conjugadas apresenta banda em torno de 1638 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$ e 1587 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$, respectivamente, enquanto um polieno com 11 ligações duplas conjugadas apresenta banda em 1514 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$ (KARAMPELAS *et al.*, 2007; SCHAFFER *et al.*, 1990). Esta característica está diretamente relacionada com o forte efeito de deslocalização eletrônica presente nos carotenoides. Isso significa que quando há aumento do número de conjugações, ocorre uma diminuição da diferença de energia da transição eletrônica (CASTRO, 2010).

1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Espectroscopia vibracional é uma análise em que se utiliza radiação eletromagnética para investigar o comportamento vibracional de moléculas, na qual se observa a absorção ou espalhamento dessa radiação (SALA, 2008).

Entre as técnicas para se obter um espectro vibracional, está a espectroscopia Raman. O efeito Raman é baseado na interação entre radiação eletromagnética e matéria, através do espalhamento de luz.

A atividade no efeito Raman está relacionada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente, conseqüentemente esse dipolo induzido irradia a luz espalhada, com ou sem mudança de energia da mesma. A intensidade dessa polarização induzida, P , é um produto vetorial da polarizabilidade, α , e do campo elétrico incidente, E :

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

A equação acima pode ser desenvolvida por série de Taylor em função da coordenada interna q , a qual caracteriza os deslocamentos das ligações ou dos ângulos entre ligações de uma molécula:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (2)$$

Os termos de ordem mais alta, podem ser desprezados devido à pequena variação da coordenada q .

Considerando a coordenada q e o vetor campo elétrico \vec{E} descritos por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_\nu t) \text{ e } \vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3)$$

Onde ν_ν e ν_0 são, respectivamente, a frequência vibracional e a da radiação incidente. Desse modo, o momento de dipolo induzido ficará:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_\nu t) \quad (4)$$

Temos que $\cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$, portanto:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_\nu)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_\nu)t] \} \quad (5)$$

Assumindo, classicamente, que os elétrons polarizados irão irradiar luz na frequência de suas oscilações, a equação 5 explica claramente que a luz será espalhada em três frequências:

Espalhamento Rayleigh: oriundo do primeiro termo da equação 5, com frequência igual ao do *laser* e magnitude proporcional à α_0 , a polarizabilidade inerente da molécula;

Espalhamento Anti-Stokes: verifica-se em $\nu_0 + \nu_\nu$;

Espalhamento Stokes: verifica-se em $\nu_0 - \nu_\nu$.

Apesar da equação 5 ter sido obtido pelo método clássico, ela demonstra informações importantes:

A Polarização e o espalhamento são linearmente dependentes com a intensidade do *laser*;

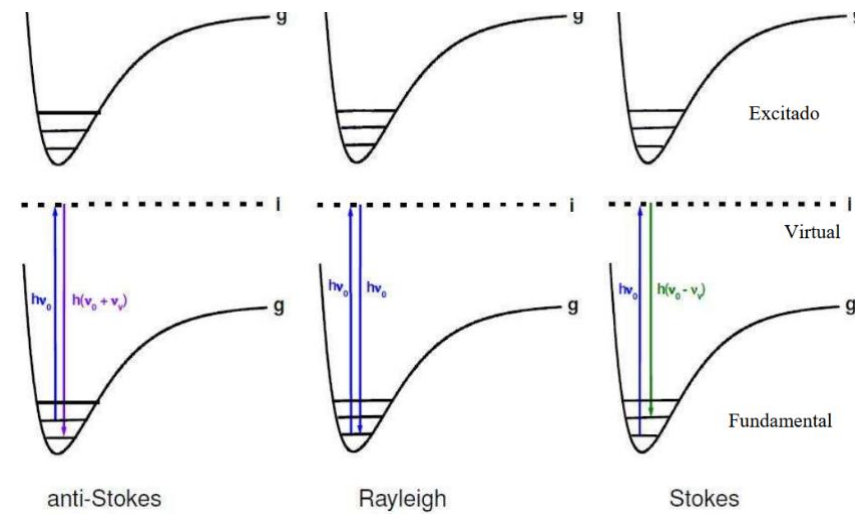
Somente vibrações que modificam a polarizabilidade, ou seja $\left(\frac{d\alpha}{dq}\right) \neq 0$, geram o espalhamento Raman;

O deslocamento Raman pode ser positivo e negativo; a frequência do *laser* é a causa do sinal, desse modo é possível medir valores positivos ou negativos em relação à origem;

$\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)$ pode variar de modo considerável para diferentes moléculas e diferentes modos, originando grandes variações na intensidade do espalhamento Raman.

Os espalhamentos inelásticos (Stokes e Anti-Stokes) e o espalhamento elástico (Rayleigh) podem ser representados esquematicamente pela figura 4. No processo correspondente ao espalhamento Rayleigh, as moléculas do material no estado fundamental recebem uma certa quantidade de energia, oriunda dos fótons incidentes, e passam para um estado intermediário virtual e em seguida, decaem novamente para o estado fundamental, emitindo (ou espalhando) fótons de mesma energia que os incidentes. Nos processos inelásticos, a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria também leva o sistema de seu estado inicial para um estado intermediário virtual, entretanto, quando o sistema decai ele não retorna para o mesmo estado vibracional incidente e a energia emitida é diferente da incidida. No espalhamento Stokes, o sistema decai para um estado vibracional mais energético e espalha fótons de menor energia. Já no Anti-Stokes, o sistema já se encontra em um estado vibracional excitado e decai para um estado vibracional de menor energia, espalhando fótons de maior energia do que os incidentes.

Figura 4- Modos de espalhamento presentes no efeito Raman.



Fonte: Adaptado de Castro (2010).

Em resumo, podemos dizer que o efeito Raman envolve estado iniciais, finais e um conjunto de estado virtuais, nos quais as suas energias não possuem um valor limite, dificultando o cálculo da intensidade, uma vez que seria necessário considerar infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica. Em 1934, G. Placzek, com o objetivo de contornar esse fato, publicou um trabalho no qual introduziu uma nova aproximação para o cálculo da polarizabilidade. Esta aproximação, conhecida como aproximação de Placzek, ou como teoria da polarizabilidade do efeito Raman, o autor considera apenas a polarizabilidade do estado fundamental. Há várias condições a serem seguidas nessa aproximação, como a energia do fóton de excitação deve ser muito menor que a energia correspondente à energia de transição eletrônica mais baixa da molécula. Ao se satisfazer tais condições, o efeito Raman é chamado de efeito Raman normal ou efeito Raman ordinário, denominação utilizada para diferenciá-lo do efeito Raman ressonante ou pré-ressonante (CLARK; HESTER, 1991). Desse modo, em uma transição Raman entre dois estados inicial (i) e final (f) em um sistema espalhador, a intensidade da luz (I_{fi}) pode ser expressa da seguinte maneira:

$$I_{fi} \propto \frac{\pi^2}{\epsilon_0^2} (\nu_0 \pm \nu_{fi})^4 E_0 [\alpha]_{fi} [\alpha]_{fi}^* \quad (6)$$

Onde:

E_0 : amplitude do campo elétrico da radiação incidente;

ν_0 : número de onda da radiação incidente;

ν_{fi} : número de onda da transição Raman final e inicial;
 ϵ_0 : permissividade no vácuo;
 $[\alpha]_{fi}$: momento de polarizabilidade de transição.

A expressão para $[\alpha]_{fi}$ é obtida através da teoria da perturbação de segunda ordem e é conhecida como equação de dispersão de Kramers-Heisenberg-Dirac, podendo ser expressa do seguinte modo:

$$[\alpha]_{fi} = \frac{1}{hc} \sum_r \frac{[\alpha]_{fr} + [\alpha]_{ri}}{\nu_{ri} + \nu_0 + i\sqrt{r}} + \frac{[\alpha]_{fr} + [\alpha]_{ri}}{\nu_{ri} - \nu_0 + i\sqrt{r}} \quad (7)$$

Onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, ν_{fi} é a frequência de uma transição eletrônica e $i\sqrt{r}$ é o fator de amortecimento, introduzido por Dirac para prevenir que a expressão se tornasse infinita quando ν_{fi} se aproximasse ou se igualasse a ν_0 . A equação 7 representa a base para a compreensão para o Raman normal (ou ordinário) e também do ressonante. Pode-se observar que, quando se utiliza uma radiação eletromagnética ν_0 próxima de uma transição eletrônica ν_{fi} ocorre uma intensificação do tensor polarizabilidade de transição e conseqüentemente, através da equação 6, ocorre um aumento da intensidade, originando o Raman ressonante. Entretanto, esse efeito de intensificação é seletivo, logo, não se apresenta de maneira uniforme por todo o espectro.

Ao se tratar da caracterização de compostos químicos, a espectroscopia Raman mostra inúmeras vantagens em relação a outros métodos, pois além de fornecer dados abrangentes e detalhados do sistema em estudo, possui tempo de análise relativamente curto, sem a necessidade de um tratamento prévio da amostra (análise *in situ*), é um método não destrutivo e não invasivo, vantagem de particular importância para matérias biológicos, sendo capaz de ser utilizada em análise de componentes traços em estado sólido, gasoso ou líquido, (MAIA; OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2017).

Dentro deste contexto, este trabalho visa caracterização por espectroscopia Raman dos carotenoides presentes nos diferentes estágios de maturação do tomate, principalmente dos intermediários chave como fitoeno, fitoflueno, ainda não descritos na literatura.

2 OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo principal a caracterização por espectroscopia Raman dos carotenoides presentes nos seis diferentes estágios de maturação do tomate, principalmente dos intermediários chave como fitoeno, fitoflueno, ainda não descritos na literatura.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar um método da extração e separação dos carotenos em amostras de tomates;

Caracterizar os polienos através de espectroscopia eletrônica;

Obter dados de estrutura eletrônica através de colaborações com o grupo de Química Computacional, como base para atribuição vibracional.

3 METODOLOGIA

A seguir, foram descritas todas as instrumentações e a metodologia teórica utilizada nesse trabalho. Também se descreveu como foi realizado todas as análises espectroscópicas e o preparo de todas as amostras.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro FT-Raman Bruker RFS 100 com um *laser* Nd³⁺/ YAG, operando com linha de excitação em 1064 nm na região do infravermelho próximo, dotado de um detector CCD e resfriado com nitrogênio líquido e no Raman Bruker-Senterra dispersivo, equipado com linhas de excitação com comprimentos de onda de 632,8 e 785 nm e um detector CCD refrigerado termoeletricamente, acoplado a um microscópio Olympus com lente objetiva de curto alcance 50x.

No equipamento FT-Raman Bruker RFS 100, foi utilizado uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ e no Raman Bruker- Senterra uma resolução de 3 cm⁻¹, para todas as amostras.

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro Ocean Optics, na região de 200 a 1100 nm, e utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

O software Bruker-OPUS foi utilizado para o tratamento de dados e para apresentação das figuras deste trabalho foi utilizado o programa Origin 2018. As deconvoluções dos espectros foram realizadas utilizando-se o programa PEAKFIT 4.12, aproximando-se as curvas pelo modelo gaussiana.

3.2 METODOLOGIA TEÓRICA

Os cálculos de estrutura eletrônica do fitoeno e fitoflueno, utilizados como base para atribuição vibracional, foram efetuados em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Antônio S. Costa, do Núcleo de Estudos em Química Computacional da UFJF. Os espectros vibracionais teóricos foram obtidos utilizando o software Gaussian09, revisão D.01 e A.02. (FRISCH *et al.*, 2009). A otimização dos pontos estacionários nas superfícies de energia potencial e os cálculos de frequência vibracional foram realizados utilizando o método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT), com o funcional híbrido B3LYP e função de base 6-311+G(2d, p) para o fitoeno e funcional híbrido RPBEPBE e função de base 6-31G(2d, p) para o fitoflueno. Os números de onda do espectro Raman do fitoflueno obtido foram escalonados por dois fatores

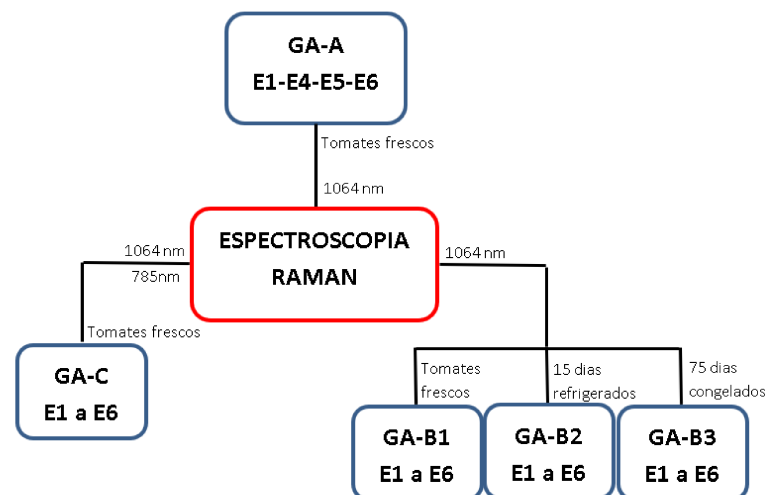
distintos quando comparado aos dados experimentais, na região em torno de 3000 cm^{-1} por 0,96 e nas demais regiões por 0,99. Já o espectro Raman do fitoeno obtido foi escalonado por um fator de 0,95 quando comparado aos dados experimentais.

3.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN NO MODO *IN SITU* APLICADA À CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO DO TOMATE

Os tomates da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill utilizados neste trabalho foram do tipo italiano e todas as amostras foram adquiridas em um mercado no município de Juiz de Fora, no período entre junho de 2018 a outubro de 2019.

As análises espectroscópicas foram realizadas com luz incidente diretamente nas peles dos tomates (*in situ*). Os diferentes grupos de amostras (GA) foram classificados de A à C. Linhas de excitação em 785 e 1064 nm foram utilizados com o objetivo de propor uma metodologia adequada para caracterização dos diversos tipos de carotenoides (Fluxograma 1).

Fluxograma 1- Análises espectroscópicas dos grupos de amostras (GA) de tomates.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.3.1 Análises espectroscópicas do grupo de amostras A (GA-A)

Análise por espectroscopia Raman dos diferentes estágios de maturação do tomate foi feito com três tomates a partir do estágio 1 (E1), os quais foram avaliados ao longo de 19 dias. As três amostras foram expostas à temperatura ambiente, a fim de avaliar o processo natural de

maturação. As análises foram feitas com tomate verde (E1), após 7 (E4), 11 (E5) e 19 dias de maturação (E6) (Fig. 5). Entretanto, apenas um dos tomates resistiu ao amadurecimento até o estágio E6 sem se deteriorar. Para as análises, uma parte da pele (exocarpo) foi retirada da polpa dos tomates, macerada e inserida em porta- amostra. Os espectros foram obtidos em equipamento FT-Raman Bruker RFS 100, com linha de *laser* operando em 1064 nm, potência de 150 mW e 1024 varreduras.

Figura 5- Grupo de amostras GA-A: verde (E1), após 7 (E4) e 11 (E5) dia.

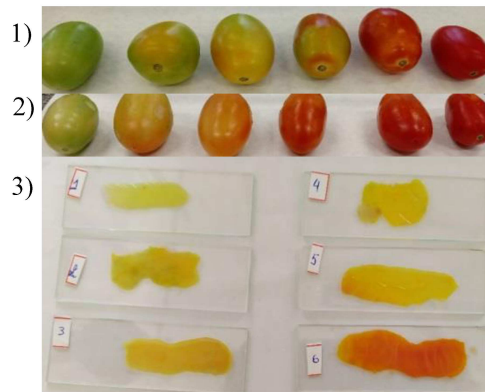


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.3.2 Análises espectroscópicas do grupo de amostras B (GA-B)

Neste grupo de amostra, (GA-B), os tomates já foram adquiridos nos seis diferentes estágios de maturação e analisados por espectroscopia Raman (1064 nm, 150 mW e 1024 varreduras) em diferentes tempos de armazenamento. Os espectros no tempo 1 (GA-B1), foram obtidos com a amostra fresca. No tempo 2 (GA-B2) com 15 dias de armazenamento no refrigerador (aproximadamente 6 °C). E no tempo 3 (GA-B3) as amostras refrigeradas foram congeladas e analisadas após 75 dias. As duas primeiras análises foram realizadas com as peles em porta- amostra e a última em lâminas de vidro (Fig. 6).

Figura 6- Grupo de amostras GA-B: 1) GA-B1, 2) GA-B2, 3) GA-B3.

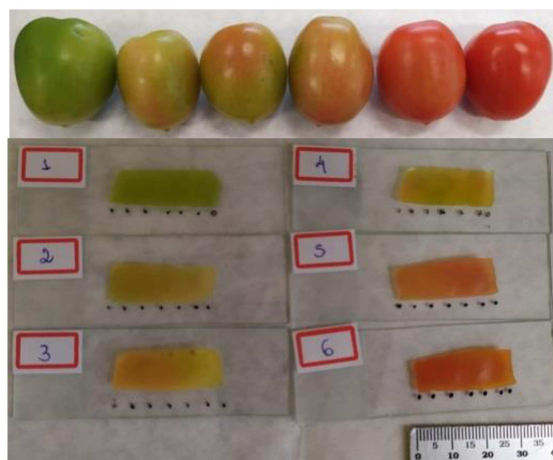


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.3.3 Análises espectroscópicas do grupo de amostras C (GA-C)

O GA-C foi composto por outro conjunto de tomates nos seis diferentes estágios, a fim de avaliar a reprodutibilidade dos dados. Foram realizados espectros com linha de excitação em 1064 nm, 150 mW e 1024 varreduras em um único ponto da amostra (peles inseridas em porta-amostra) e espectros com linha de excitação em 785 nm, 100 mW e 5 coadições por 10 segundos em uma superfície de três centímetros de comprimento, em seis diferentes pontos separados 0,5 centímetros um do outro (Fig. 7).

Figura 7- Grupo de amostras GA-C.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os tomates utilizados no preparo dos extratos foram da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill do tipo italiano e todas as amostras foram adquiridas em um mercado no município de Juiz de Fora, no período entre junho de 2018 a outubro de 2019.

3.4.1 Extração com etanol

Esse método de extração foi desenvolvido por Calvo, Dado e Santa-Maria (2006). Após a higienização das amostras, as peles (exocarpos) foram removidas das polpas (pericarpos), posteriormente congeladas e submetidas ao processo de liofilização. Em seguida, as peles foram trituradas com o auxílio de um pistilo e um almofariz. Na sequência, o material homogeneizado foi colocado em um béquer protegido da luz, mantido em atmosfera de nitrogênio no congelador até o momento da extração.

Para a extração, 5 g da pele liofilizada foram umedecidos com 400 mL de etanol a 25 °C; posteriormente, a mistura foi agitada por um agitador magnético sob ausência de luz, a 25 °C por 5 minutos. Após a extração, a solução foi filtrada através de papel de filtro de alta porosidade. O mesmo procedimento foi realizado por três vezes. O filtrado foi concentrado por evaporação do solvente no evaporador rotatório e em seguida submetido à análise espectroscópica.

3.4.2 Extração com acetona e partição com éter de petróleo

Esse método de extração dos tomates foi feito a partir do método desenvolvido por RODRIGUEZ-AMAYA (2001). Após a higienização das amostras, cerca de 100 g do exocarpo foram triturados por 60 segundos com 100 mL de acetona, com o auxílio de um mixer. A solução foi filtrada por sucção através de funil de vidro sinterizado e em seguida o resíduo e o mixer foram lavados com 100 mL de acetona. A extração e a filtração foram repetidas por 3 vezes ou até que a lavagem do resíduo ficasse incolor.

Para a partição, aproximadamente 100 mL de éter de petróleo foram adicionados em um funil de separação e em seguida, uma pequena porção do extrato em acetona. Adicionou-se água destilada lentamente pelas paredes do funil e sem agitação para evitar a formação de emulsão. Após a separação das duas fases descartou-se a acetona aquosa inferior. A adição do

extrato acetônico e da água destilada foram repetidos até que todo extrato fosse transferido para o éter de petróleo e por fim, lavou-se com água destilada por 5 vezes para remover a acetona residual. A secagem foi feita com a adição de sulfato de sódio ao extrato de éter de petróleo até a formação de alguns cristais. A solução foi concentrada até um pequeno volume, cerca de 1 mL, em um rotavapor, com temperatura não superior a 40 °C (Fluxograma 2).

3.5 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CAROTENOS

A separação dos carotenos foi realizada através de uma coluna aberta, por um método desenvolvido por RODRIGUEZ-AMAYA (2001).

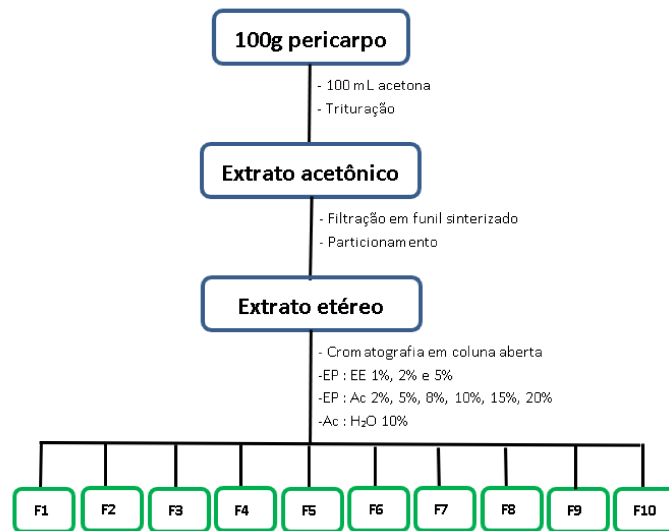
Para a preparação da coluna, um pequeno pedaço de algodão foi inserido na parte inferior da coluna e cerca de 20 cm de adsorvente (Hyflosupercel-óxido de magnésio; 2:1) foi adicionado. Aplicou-se vácuo moderado para a compactação da coluna em torno de 12 cm e cobriu-se a coluna com aproximadamente 1 cm de sulfato de sódio. Passou-se cerca de 50 mL de éter de petróleo pela coluna e o vácuo foi ajustado para que o fluxo do solvente fosse de 2 a 3 gotas por segundo. Uma vez adicionado o éter de petróleo, manteve-se o topo da coluna coberto com solvente até o fim da cromatografia.

Após a adição do extrato, para o desenvolvimento da coluna foram adicionados aproximadamente 50 mL de 1%, 2% e 5% (v/v) de éter etílico (EE) em éter de petróleo (EP), em seguida, 2%, 5%, 8%, 10%, 15% e 20% (v/v) de acetona (Ac) em éter de petróleo e por fim, 10% (v/v) de água em acetona.

De acordo com o método de separação dos carotenos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), o primeiro a eluir é o fitoeno, seguido pelo fitoflueno, β - caroteno, ζ - caroteno, γ -caroteno, neurosporeno e licopeno.

As frações obtidas a partir da partição do extrato acetônico em éter de petróleo foram denominadas de F1 a F10, de acordo com o percentual dos solventes utilizados na cromatografia em coluna aberta (Fluxograma 2). As frações foram mantidas à temperatura ambiente, na capela, sob ausência de luz, para a evaporação do solvente.

Fluxograma 2- Preparação do extrato acetônico, etéreo e purificação dos carotenos.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA À ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS.

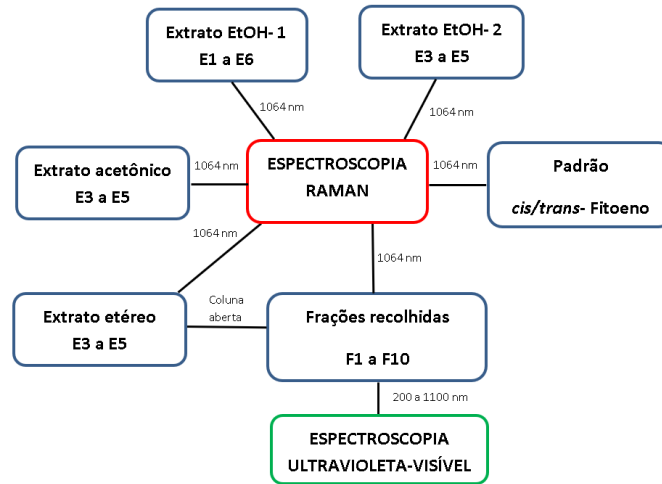
Os espectros Raman foram feitos em equipamento FT-Raman Bruker RFS 100, com linha de *laser* operando em 1064 nm (150 mW, 1024 varreduras), em amostras inseridas no porta- amostra. As análises foram obtidas com extrato etanólico feito com peles de tomates em todos os estágios de maturação (EtOH-1), com extrato etanólico contendo apenas peles de tomates nos estágios E3, E4 e E5 (EtOH- 2), com extrato acetônico e extrato obtido após a partição com éter de petróleo de peles de tomates nos estágios E3, E4 e E5. Foram feitas também análises das frações obtidas a partir da cromatografia e do padrão de *cis/trans* – fitoeno (Sigma-Aldrich; lote: BCBZ8756) (Fluxograma 3).

3.7 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOLOGRAFIA EM COLUNA

As amostras foram diluídas em éter de petróleo e adicionadas em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico para obtenção dos espectros eletrônicos no equipamento Ocean Optics, operando na região de 200 a 1100 nm (Fluxograma 3).

O fluxograma 3 resume as etapas das análises espectroscópicas.

Fluxograma 3- Análises espectroscópicas dos extratos, frações e do padrão de *cis/trans*-fitoeno.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho foram divididos em quatro tópicos. No primeiro, foi discutido o resultado das análises *in situ* das peles de tomates nos diferentes estágios de maturação, seguido pelas análises dos extratos obtidos. No terceiro tópico, foi discutido os resultados obtidos com o isolamento e purificação dos carotenos, e por fim, no último tópico, foi apresentado e discutido os resultados obtidos para os carotenos fitoeno e fitoflueno.

4.1 ANÁLISES POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS PELES DOS TOMATES NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

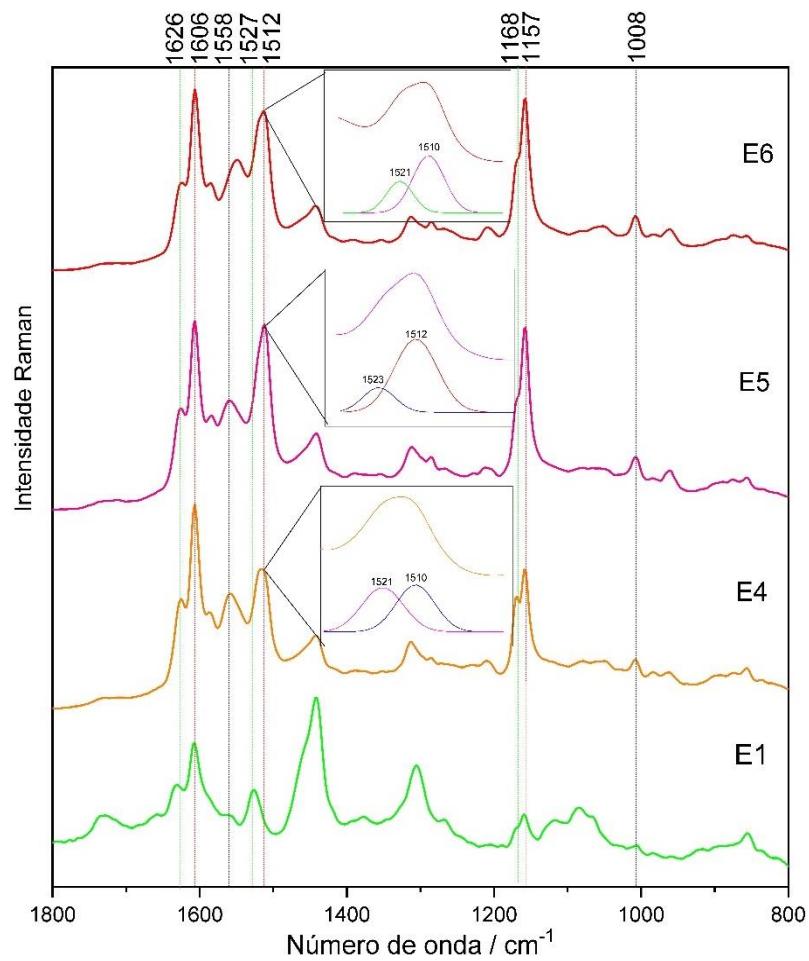
Os espectros Raman obtidos das amostras (GA-A) *in situ* nos diferentes estágios de maturação mostraram bandas majoritárias atribuídas a compostos fenólicos (MACHADO *et al.*; 2013; TESLOVA *et al.*, 2007) e carotenoides (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SAITO; TASUMI, 1983). A ocorrência de fenólicos foi proposta devido à presença de bandas na faixa de 1630-1580 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}$, 1270-1250 cm^{-1} $\delta(\text{OH})/\nu(\text{C}-\text{O})$, enquanto que os carotenoides através do conjunto de bandas entre 1527-1511 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1168-1157 $\nu(\text{C}-\text{C})$ e 1008 cm^{-1} $\rho(\text{C}-\text{CH}_3)$. As bandas referentes aos compostos fenólicos apresentaram o mesmo perfil espectral em todas as amostras (Fig. 8), entretanto as bandas características de carotenoides apresentaram variações entre os estágios de maturação.

A comparação entre as bandas Raman do tomate verde e os demais estágios indicaram a ocorrência de carotenoides contendo 7, 9 e 11 insaturações. O perfil alargado da banda com intensidade máxima em 1512 cm^{-1} , atribuído a polienos com $N=11$, sugere que bandas em torno de 1520 cm^{-1} ($N=9$) estejam subpostas (Anexo A, Tabela 10). A deconvolução da banda entre 1480 e 1550 cm^{-1} mostrou a ocorrência de duas bandas: 1521 e 1510 cm^{-1} , atribuídos a carotenos com $N=9$ e $N=11$, respectivamente.

A tabela 1 mostra as principais bandas observadas e a relação entre número de insaturações conjugadas e a posição das bandas Raman (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SCHAFFER *et al.*, 1990). A rota biossintética proposta para o licopeno ($N=11$ insaturações) (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, *et al.*, 2015) tem como precursores carotenos contendo 3, 5, 7 e 9 insaturações (Fig. 2). Os resultados obtidos sugeriram a presença de moléculas contendo 7, 9 e 11 insaturações ao longo do processo de maturação, entretanto as moléculas com 3 e 5 insaturações conjugadas poderiam estar subpostas às bandas em torno 1630 e 1585 cm^{-1} que coincidem as

bandas dos fenólicos (Fig. 8, Anexo A). Estes resultados obtidos corroboram com estudos anteriores feitos por marcação isotópica (^{14}C do ácido mevalônico) os quais não identificaram nos estágios iniciais de maturação o fitoeno e nenhuma ou baixas concentrações de ζ -caroteno (HAMAUZU; CHACIN; UEDA, 1998). Estes dados preliminares foram apresentados no XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- Minas Gerais (09-11/11/18).

Figura 8- Espectros Raman das peles de tomates, (GA-A), obtidos com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 1- Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-A).

Tentativa de atribuição	N*	E1	E4	E5	E6
		1º dia	7º dia	11º dia	19º dia
v(C=C)	7	1558 _f	1558 _m	1558 _m	1548 _m
	9	1527 _m	1521 _{ml}	1520 _{il}	1521 _{il}
	11	-	1510 _{ml}	1512 _{il}	1510 _{il}
v(C-C)	7	1168 _f	1168 _m	1168 _m	1168 _m
	9	1157 _f	1157 _m	1157 _i	1157 _i
	11				

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*N= número de insaturações conjugadas em polienos (Schaffer *et al.*, 1990).

Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca, l=larga.

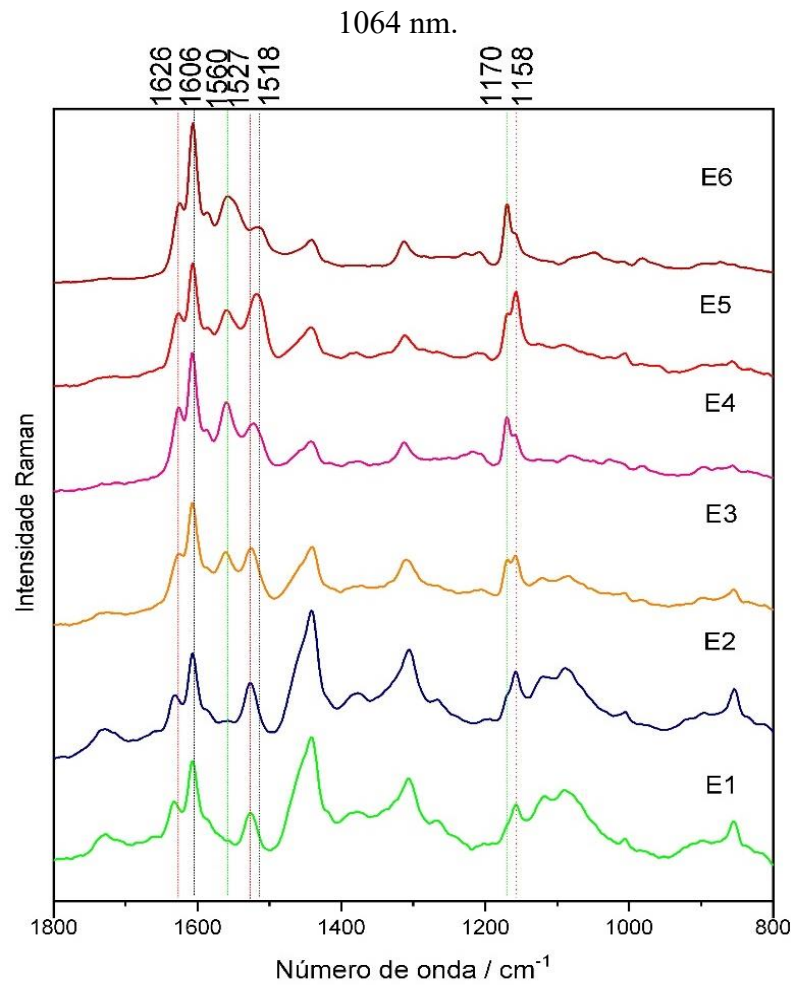
Os resultados indicaram que seria mais viável utilizar os tomates nos seus respectivos estágios de maturação, garantindo assim a preservação do material biológico e redução do tempo de análise espectroscópica.

A análise dos espectros Raman dos seis diferentes estágios de maturação observados nas amostras (GA-B1) (Fig. 9, Tabela 2), mostrou diferenças na posição das bandas características dos carotenoides. Nos estágios E6 e E5 a intensidade máxima da banda referente ao modo v(C=C) característico de N=9 está em torno de 1518 cm^{-1} , enquanto nos demais estágios esta banda ocorre em torno de 1527 cm^{-1} . Essa variação na posição e intensidade da banda poderia ser atribuída a uma mudança na composição dos carotenoides durante o amadurecimento. Como já mencionado, os tomates contêm vários tipos de carotenoides, como o licopeno, β -caroteno e ζ -caroteno, e o aumento na proporção de licopeno nos carotenoides totais depende da maturidade do tomate (FRASER *et al.*, 1994; SCHULZ; BARANSKA; BARANSKI, 2005).

Embora o E6 corresponda ao tomate maduro onde a concentração de licopeno deveria ser maior, neste grupo de amostras a banda referente ao modo v(C=C) de maior intensidade está em torno de 1560 cm^{-1} , típica de carotenos com N=7 (SCHAFFER *et al.*, 1990). O modo vibracional v(C-C) em torno de 1170 cm^{-1} também aparece mais intenso em relação a banda em 1158 cm^{-1} . Estes modos vibracionais foram observados em todos os estágios sendo que nos E1 e E2 as bandas estão menos intensas quando comparado com os estágios E3 a E6. Baseado na coloração do tomate esperava-se que estágio E6 tivesse predominância da banda em torno de 1518 cm^{-1} (N=11) em relação a 1560 cm^{-1} (N=7). Entretanto, o processo de amadurecimento é

enzimático, o que provavelmente não impede que outras substâncias sejam produzidas paralelamente, além do que talvez a fruta não tenha atingido o máximo de maturidade. Embora o tomate estivesse visualmente maduro as coletas dos espectros foram feitas em pontos aleatórios na amostra. A correlação entre intensidade das bandas e composição carotenóidica indicou a alternância de polienos com diferentes comprimentos de cadeias conjugadas ao longo do processo de maturação.

Figura 9- Espectros Raman das peles de tomates (GA-B1), obtidos com *laser* operando em



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 2- Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B1).

Tentativa de atribuição	N*	E1	E2	E3	E4	E5	E6
v(C=C)	7	-	-	1560 _f	1560 _m	1560 _m	1558 _m
	9	1527 _f	1527 _f	1525 _{fl}	1523 _{fl}	1518 _{il}	1518 _{fl}
	11	-	-		-	-	-
v(C-C)	7	-	-	1169 _f	1170 _m	1168 _m	1170 _m
	9	1157 _f	1157 _f	1158 _f	1159 _f	1157 _i	1159 _f
	11						

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*N= número de insaturações conjugadas em políenos (Schaffer *et al.*, 1990).

Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca, l=larga.

Na análise das amostras GA-B2 (Fig. 10, Tabela 3) observou-se algumas diferenças espectrais, principalmente no estágio E1, que apresentou baixa intensidade das bandas Raman. No estágio E2 observa-se que as bandas em torno de 1560 e 1170 cm^{-1} são mais intensas do que no estágio E2 do GA-B1. Entre os grupos de amostras do GA-B1e GA-B2 foram observadas variações nas intensidades das bandas 1560/1170 cm^{-1} em relação às bandas 1523-1514/1157 cm^{-1} nos estágios E3 e E4. Os estágios E5 e E6 mostraram o mesmo perfil espectral nos dois grupos de amostras. Estes resultados sugerem que o processo de amadurecimento esteja ocorrendo mesmo armazenado no refrigerador (FRASER *et al.*, 1994; SCHULZ; BARANSKA; BARANSKI, 2005).

Figura 10- Espectros Raman das peles de tomates (GA-B2), obtidos com *laser* operando em 1064 nm.

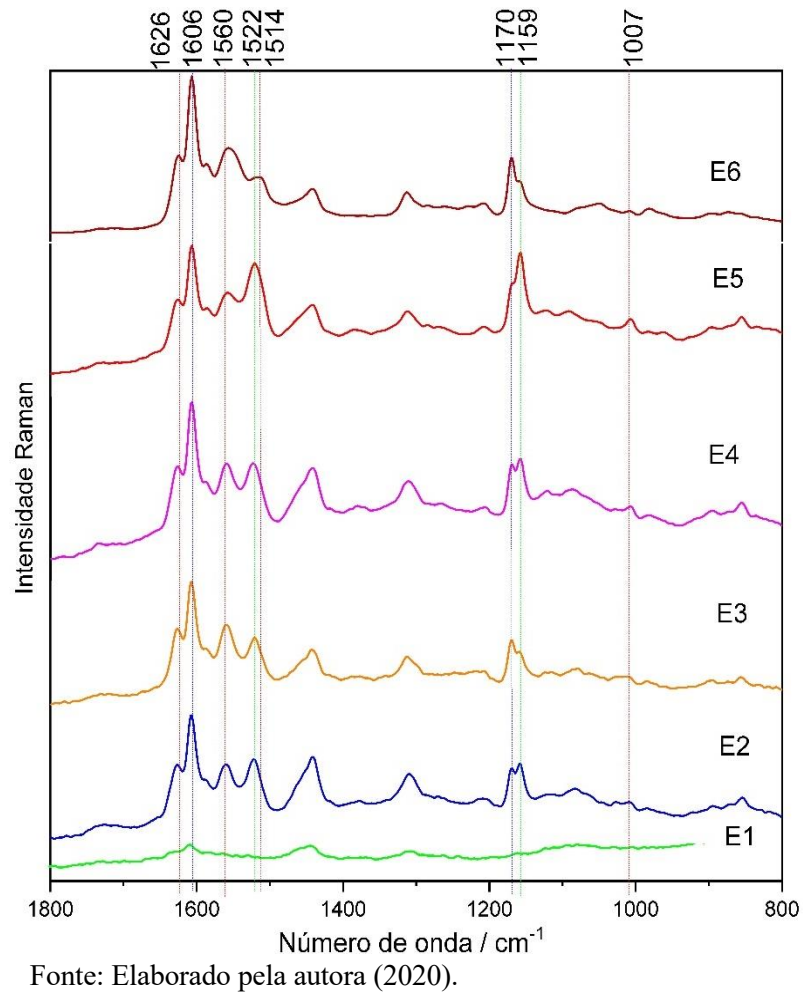


Tabela 3- Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B2).

Tentativa de atribuição	N*	E1	E2	E3	E4	E5	E6
v(C=C)	7	-	1560 _f	1560 _m	1560 _m	1560 _m	1556 _m
	9	1527 _f	1521 _f	1520 _{fl}	1522 _{ml}	1521 _{il}	-
	11	-	-	-	-	-	1514 _{fl}
v(C-C)	7	-	1169 _f	1170 _m	1169 _m	1169 _m	1170 _m
	9	1159 _f	1157 _f	1159 _f	1159 _m	1157 _i	1159 _f
	11						

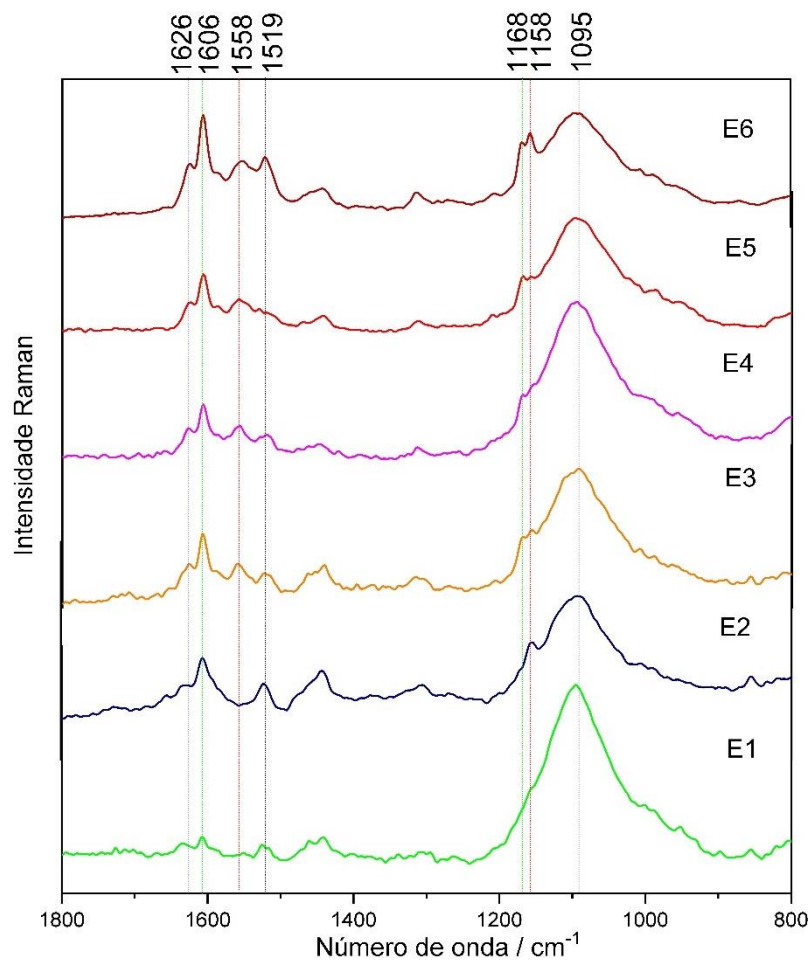
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*N= número de insaturações conjugadas em políenos (Schaffer *et. al.*, 1990).

Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca, l=larga.

Os espectros das amostras GA-B3 (Fig. 11, Tabela 4) foram obtidos com as peles após congelamento depositadas na superfície da lâmina de vidro. As intensidades das bandas registradas foram menores do que as dos espectros feitos com as amostras inseridas no porta-amostra. O perfil espectral foi um pouco diferente das amostras GA-B1 e GA-B2, observou-se uma inversão da relação entre as intensidades das bandas em torno de 1558 e 1520 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$ para os estágios E4, E5 e E6. Estes resultados indicaram que o processo de congelamento pode alterar a composição dos metabólitos na superfície do tomate. Dados da literatura revelaram que carotenoides em frutas e outros vegetais sofrem isomerização durante o processamento e / ou estocagem e, como consequência, pode ocorrer diminuição na intensidade da cor e redução da bioatividade (RODRIGUEZ- AMAYA, 2001).

Figura 11- Espectros Raman das peles de tomates (GA-B3), obtidos com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

* banda referente ao vidro.

Tabela 4- Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}) (GA-B3).

Tentativa de atribuição	N*	E1	E2	E3	E4	E5	E6
v(C=C)	7	1556 _f	-	1560 _f	1558 _f	1558 _f	1556 _m
	9	1525 _f	1523 _m	1521 _f	-	-	1519 _m
	11	-	-	-	-	-	-
v(C-C)	7	-	-	1169 _f	1169 _f	1170 _f	1169 _f
	9	1158 _f	1155 _f	1157 _f	1169 _f	1159 _f	1157 _f
	11						

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*N= número de insaturações conjugadas em polienos (Schaffer *et. al.*, 1990).

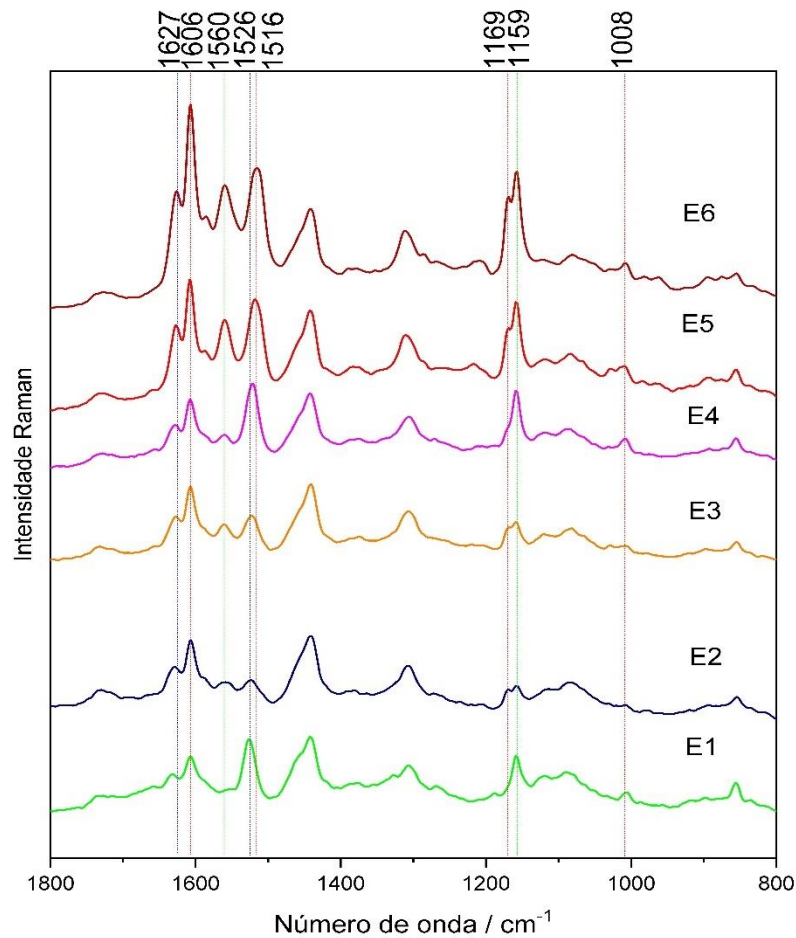
Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca, l=larga.

Com a finalidade de se avaliar a reprodutibilidade dos dados, foi analisado um grupo de amostras denominado de GA-C (Fig.12, Tabela 5). Os espectros obtidos com tomates nos seis estágios de maturação apresentaram um perfil espectral semelhante às análises anteriores. No estágio E1 bandas referentes aos carotenoides contendo 7 insaturações conjugadas (em torno de 1560 e 1170 cm^{-1}) não foram atribuídas, mas os demais estágios apresentaram bandas que podem indicar a presença dos carotenoides contendo 7, 9 e 11 ligações conjugadas (SCHAFFER *et al.*, 1990).

Carotenos cíclicos com N=9 (p.ex. β -caroteno) são biossintetizados em etapa posterior ao licopeno (N=11), entretanto, estão presentes desde o estágio E1 juntamente com caroteno N=7 (p.ex. ζ -caroteno) o qual pode ser melhor observado a partir do estágio E2. Estudos sobre regulação de expressão gênica durante carotenogênese do tomate revelaram que β -caroteno acumula nos tecidos antes de se iniciar o processo de amadurecimento (TAN *et. al.*, 2017).

A análise das intensidades Raman neste grupo de amostras mostrou um deslocamento da banda referente ao modo v(C=C) para menores números de onda à medida que o tomate amadurece (1521 para 1516 cm^{-1}), indicando o acúmulo do licopeno nos estágios E5 e E6.

Figura 12- Espectros Raman das peles de tomates (GA-C), obtidos com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 5- Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm⁻¹) (GA-C).

Tentativa de atribuição	N*	E1	E2	E3	E4	E5	E6
v(C=C)	7	-	1558 _f	1560 _f	1560 _f	1560 _m	1560 _m
	9	1525 _{il}	1523 _{fl}	1523 _{fl}	1521 _{il}	1518 _{il}	-
	11	-	-	-	-	-	1516 _{ml}
v(C-C)	7	-	1169 _f	1168 _f	1170 _m	1169 _m	1169 _m
	9	1159 _i	1157 _f	1159 _f	1159 _i	1159 _i	1157 _m
	11						

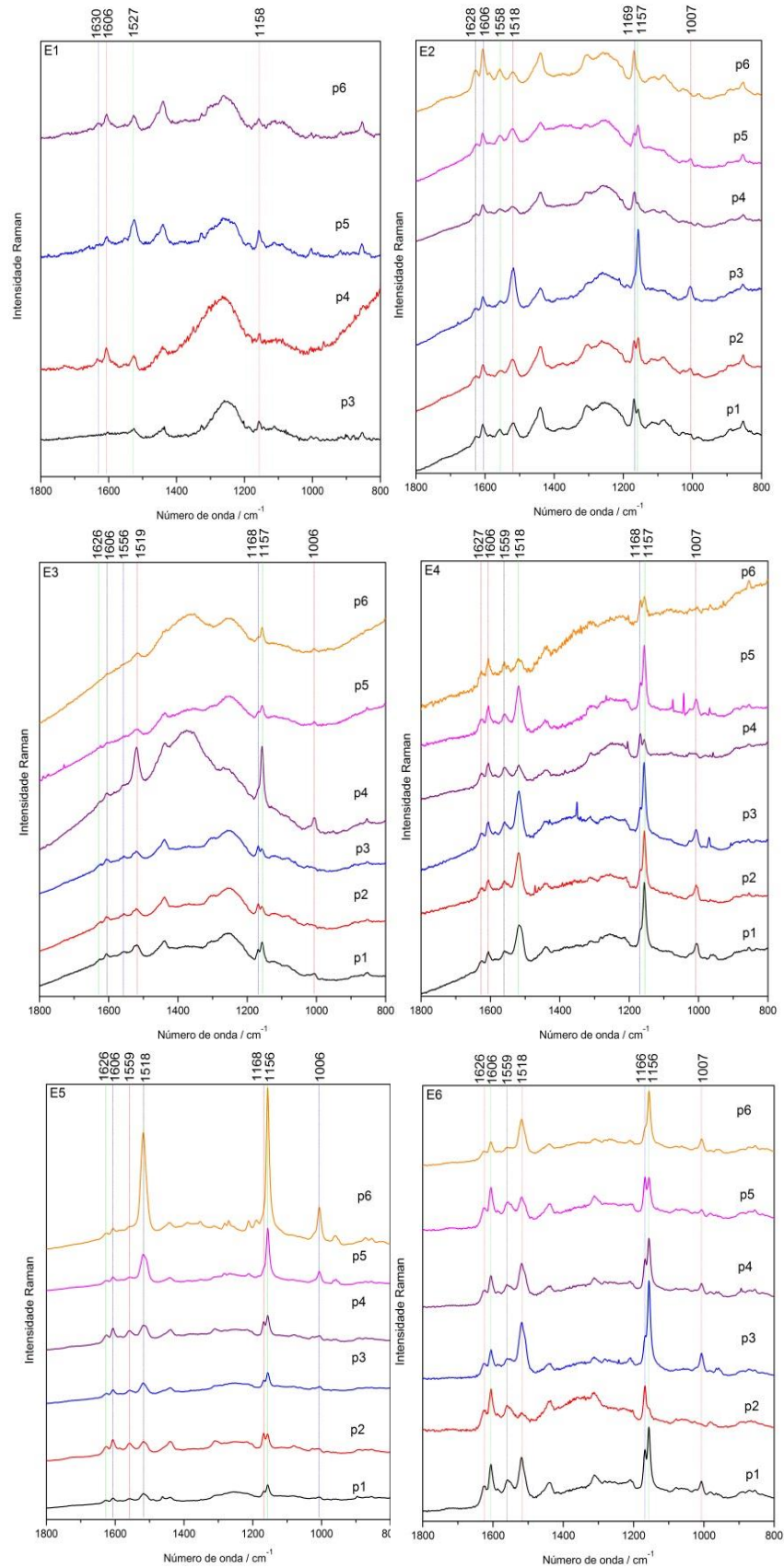
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*N= número de insaturações conjugadas em polienos (Schaffer *et. al.*, 1990).

Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca, l=larga.

Este mesmo grupo de amostras, GA-C, foi também investigado na região com linha de excitação em 785 nm (Fig. 13). Os espectros Raman apresentaram perfil espectral similar ao observado com a linha de excitação em 1064 nm. A análise feita em seis pontos distribuídos em sequência linear mostrou a ocorrência dos carotenoides presentes em uma área pré-selecionada da pele dos tomates nos seis estágios. Com exceção do estágio E1, os demais estágios mostraram diferenças na composição destes pigmentos. No estágio E1 observou-se predominantemente bandas referentes a carotenoides com 9 ligações conjugadas. Nos demais estágios observaram-se as bandas referentes aos carotenoides com 7, 9 e 11 ligações conjugadas. A Figura 13 mostra variações na intensidade das bandas referentes aos modos vibracionais $\nu(\text{C}=\text{C}/\text{C}-\text{C})$ nos diferentes pontos coletados. Estes resultados mostraram que a distribuição dos carotenoides na superfície (pele) não é homogênea e apresenta alternância de pigmentos independente do estágio de maturação.

Figura 13- Espectros Raman das peles de tomates (GA-C), obtidos com laser operando em 785 nm.

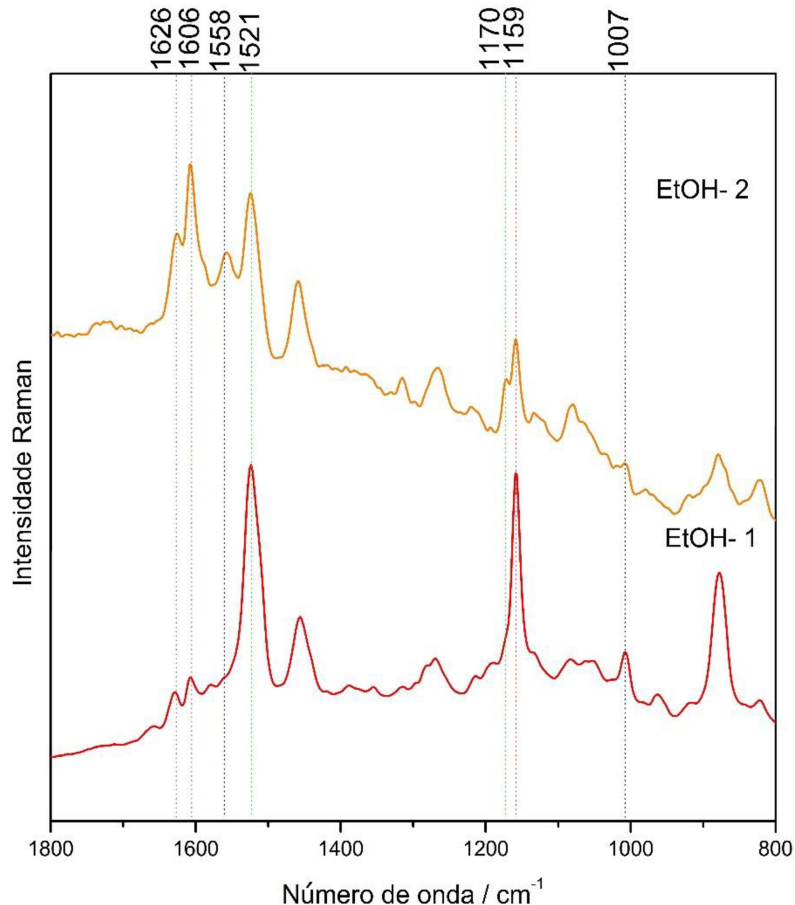


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

As peles dos tomates foram extraídas com etanol e acetona visto que são os solventes mais indicados para extração de carotenos. O extrato etanólico EtOH-1 foi obtido a partir de tomates em todos os estágios de maturação, enquanto que o extrato EtOH- 2 foi composto de tomates nos estágios E3, E4 e E5. A seleção desses estágios visou à obtenção de um extrato mais enriquecido com os carotenoides de interesse, fitoeno e fitoflueno, visto que nos estágios iniciais há muita clorofila e no último estágio, o acúmulo de licopeno (FRASER *et al.*, 1994). A análise dos espectros mostra diferenças na composição carotenóidica entre os extratos (Fig. 14), no EtOH-1 observa-se bandas de estiramento carbono-carbono (C=C/C-C) em torno 1521/1159 cm^{-1} , enquanto que no EtOH- 2 observam-se bandas em torno de 1525/1159 cm^{-1} e 1558/ 1170 cm^{-1} , indicando presença de carotenos com maior e menor número de ligações duplas conjugadas, respectivamente (SCHAFFER *et al.*, 1990).

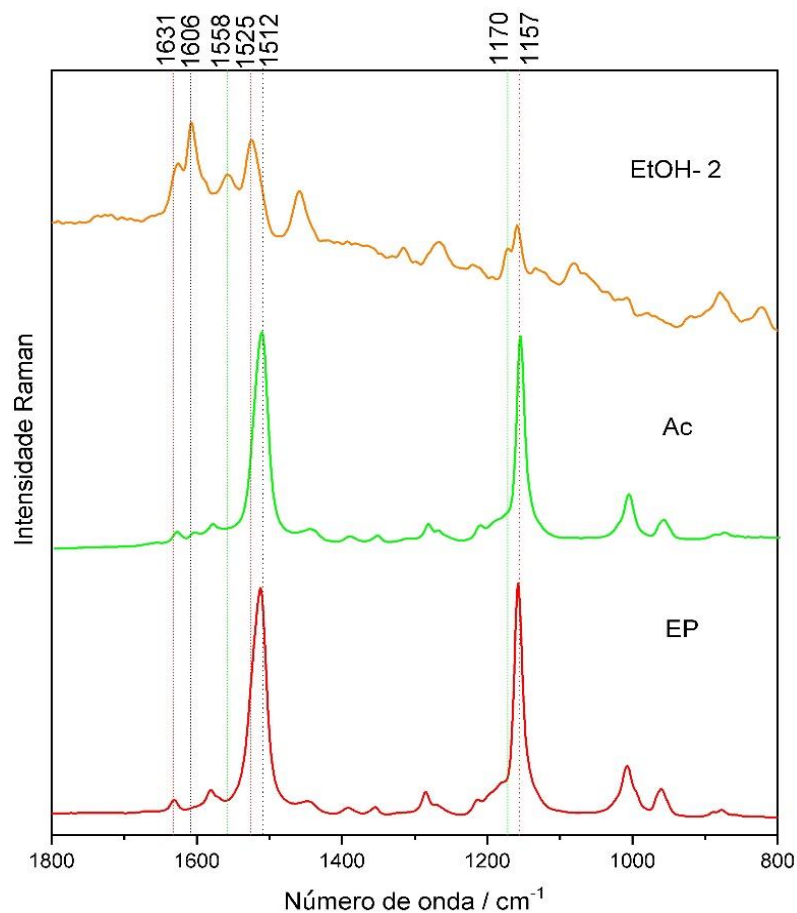
Figura 14- Espectros Raman dos extratos EtOH-1 e EtOH- 2, obtidos com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Apesar do extrato EtOH-2 apresentar maior variedade de carotenos, as bandas correspondentes as substâncias fenólicas estão bastante intensas. Com base nestes resultados, selecionamos outra metodologia de extração que priorizasse a obtenção de carotenoides, minimizando assim a presença de flavonoides e ácidos graxos nos extratos (Fig. 15). Desse modo, apenas os tomates nos estágios E3, E4 e E5 foram utilizados na extração com acetona seguida de partição com éter de petróleo (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 15- Espectros Raman dos extratos etanólico (EtOH- 2), acetônico (Ac) e após partição com éter de petróleo (EP), obtidos com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na figura 15, observa-se diferenças espectrais entre os diferentes extratos preparados por metodologias diferentes. No extrato etanólico EtOH- 2, como já mencionado, observam-se bandas em torno de 1525/1159 cm^{-1} e 1558/ 1170 cm^{-1} , além de bandas atribuídas a compostos fenólicos em torno de 1626, 1606 e 1587 cm^{-1} . Já no extrato acetônico, as bandas atribuídas aos compostos fenólicos diminuíram de intensidade e após a partição com éter de petróleo, as bandas em torno de 1606 e 1587 cm^{-1} não foram observadas, apenas as bandas em torno de

1630 e 1580 cm^{-1} , as quais poderiam também ser atribuídas ao modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{C})$ de carotenos contendo 3 e 5 insaturações conjugadas, respectivamente. A obtenção de carotenos com menor número de insaturações no extrato etéreo pode ser explicada devido a maior solubilidade destas moléculas em solventes mais apolares.

Os resultados obtidos através da espectroscopia Raman mostraram que a técnica é capaz de discriminar diferenças estruturais nos carotenos presentes em extratos brutos preparados por diferentes metodologias, entretanto a purificação e isolamento dos carotenos para a identificação de cada componente requer a utilização de técnicas cromatográficas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

O espectro eletrônico na região do ultravioleta e visível é uma das principais ferramentas para a identificação dos carotenoides, o comprimento de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e a forma da banda são característicos, e quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, maior será o comprimento de onda das absorções. Para que um carotenoide apresente cor perceptível são necessárias sete ligações duplas conjugadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). O extrato etéreo, feito com tomates nos estágios E3, E4 e E5, cromatografado em coluna aberta (Fluxograma 2), forneceu 10 frações, sendo que 8 delas foram analisadas primeiramente por espectroscopia na região do UV-Vis. Segundo o protocolo descrito por RODRIGUEZ-AMAYA (2001), a ordem de eluição dos carotenos presentes no tomate são fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, neurosporeno e licopeno. Na tabela 6, encontram-se os comprimentos de onda (nm) de absorção destes carotenos descritos na literatura (RODRIGUEZ-AMAYA; 2001) para comparação com os obtidos neste trabalho. Com exceção do ζ -caroteno, que possui o terceiro comprimento de onda de absorção como o máximo ($\lambda_{\text{máx}} = 425 \text{ nm}$), os demais possuem o segundo como o máximo ($\lambda_{\text{máx}}$).

Tabela 6- Comprimentos de onda (nm) de absorção de carotenos em éter de petróleo.

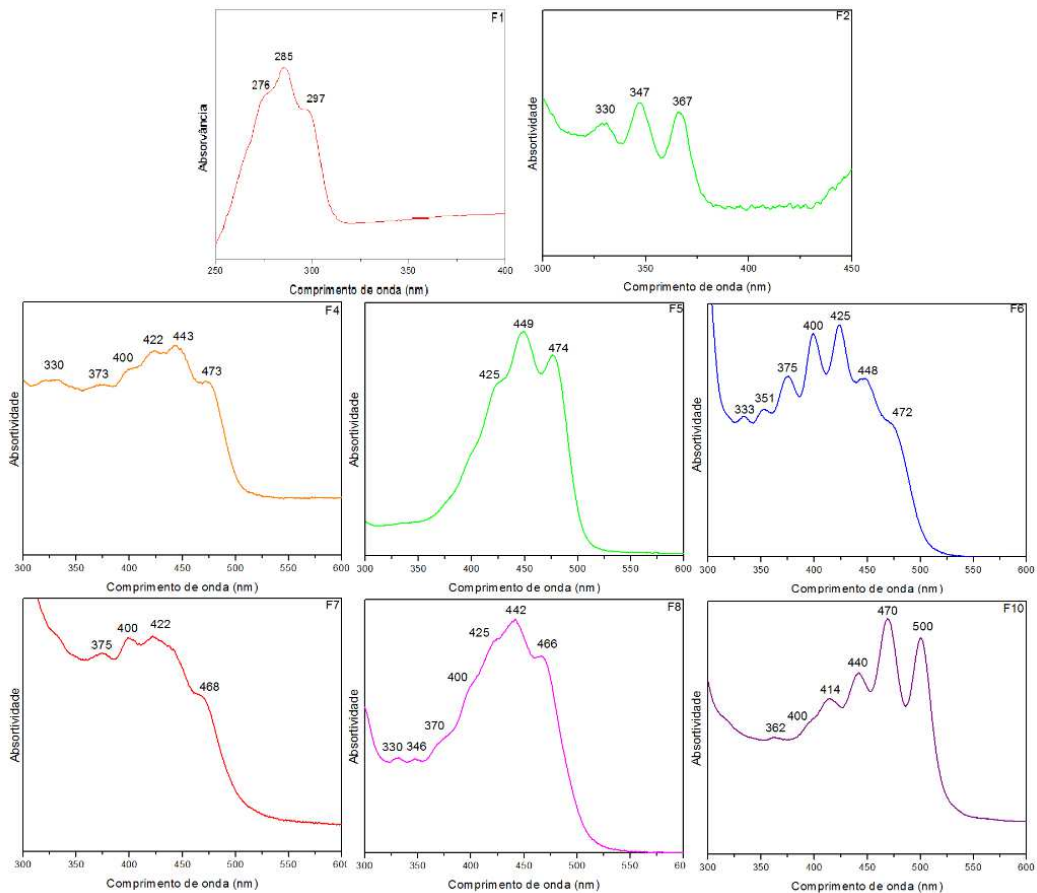
	λ	λ	λ
Fitoeno	276*	286	297*
Fitoflueno	331	348	367
ζ -caroteno	378	400	425
β -caroteno	425*	450	477
γ -caroteno	437	462	494
Neurosporeno	414	439	467
Licopeno	444	470	502

Fonte: Adaptado de Rodriguez-Amaya (2001).

* indica que a banda é um ombro.

Na figura 16 observa-se os espectros eletrônicos das frações obtidas, com exceção das frações F3 e F9. O espectro UV-Vis da fração F1 (Fig. 16), que é uma fração incolor, revelou a presença de bandas em 275, 285 e 297 nm, perfil semelhante ao do fitoeno já descrito (Tabela 6). A fração F2 (Fig. 16), também incolor, apresentou bandas de absorção em 330, 347 e 367 nm, que coincidem com as do fitoflueno (Tabela 6). As frações F4, F7 e F8 (Fig. 16) apresentaram bandas de absorção em vários comprimentos de onda, o que indica uma baixa eficiência na separação dos carotenos pela cromatografia em coluna realizada. Já o espectro eletrônico da fração F5 (Fig. 16), possui um perfil similar ao espectro de absorção do β -caroteno, com bandas de absorção em 425 (ombro), 449 e 474 nm (Tabela 6). O espectro eletrônico da fração F6 (Fig. 16) possui bandas de absorção em 375, 400, 425 ($\lambda_{\text{máx}}$) e duas bandas de baixa intensidade em 448 e 472 nm, as quais podem indicar uma mistura de ζ -caroteno e β -caroteno (Tabela 6). A fração F10 apresenta-se como mistura complexa (Fig. 16), as bandas em 414, 440, 470 ($\lambda_{\text{máx}}$) poderiam ser atribuídas ao neurosporeno, e a presença da banda em 502 nm pode sugerir a co-ocorrência com licopeno (444, 470 e 500 nm) (Tabela 6).

Figura 16- Espectros eletrônicos das frações obtidas através do extrato etéreo (E3, E4 e E5) cromatografado em coluna aberta.



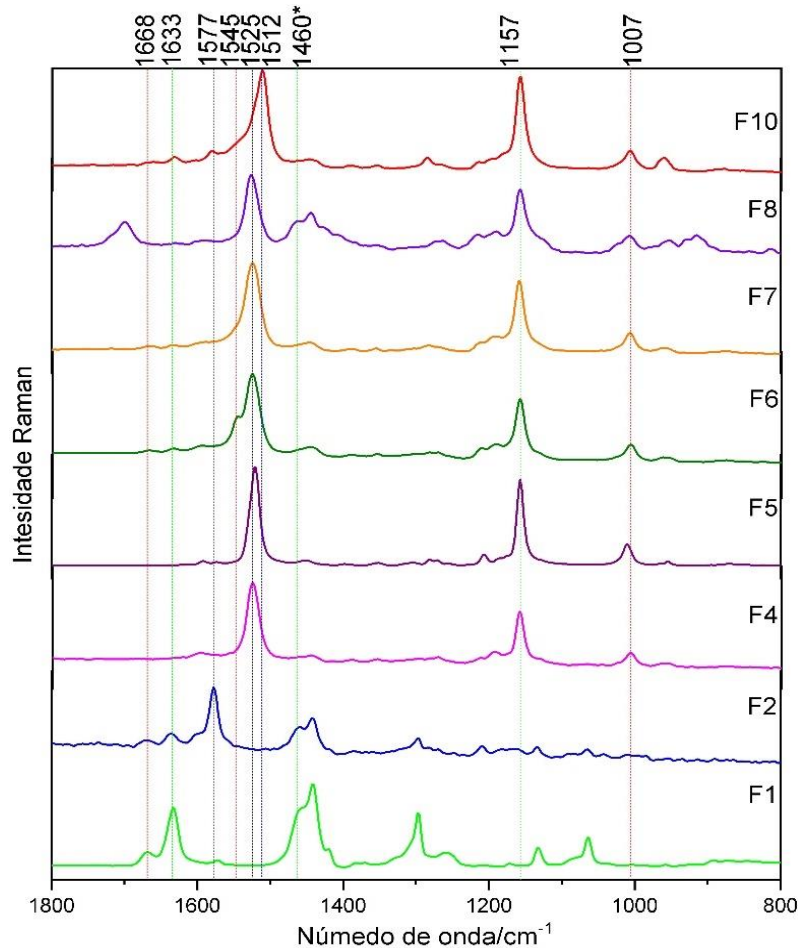
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A etapa seguinte foi avaliar cada fração recolhida por espectroscopia Raman. A tabela 7 mostra a atribuição das principais bandas Raman tais como $\nu_1(\text{C}=\text{C})$, $\nu_2(\text{C}-\text{C})$, $\rho(\text{C}-\text{CH}_3)$ e o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada fração.

O espectro Raman da fração F1 apresentou bandas em 1668 e 1630 cm^{-1} , características do modo $\nu(\text{C}=\text{C})$ em sistemas contendo até três insaturações conjugadas (KARAMPELAS *et al.*, 2007; SCHAFFER *et al.*, 1990), além das bandas em 1440 cm^{-1} atribuídas aos modos $\delta(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ e $1257, 1131 \text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{CH})$ comumente encontrados em terpenos (JENTZSCH; CIOBOTA, 2014; SCHULZ; BARANSKA, 2007) (Fig. 17). Estes dados juntamente com os resultados obtidos no UV-Vis (Tabelas 6 e 7) sugerem a ocorrência do fitoeno. Já a fração F2 mostrou bandas referentes às ligações duplas conjugadas em $1670, 1637, 1577 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{C})$ e espectro eletrônico compatível com fitoflueno (Tabelas 6 e 7). As frações F4, F5, F7 e F8, possuem bandas de $\nu(\text{C}=\text{C})$ em torno de 1525 cm^{-1} (Fig. 17) que podem ser atribuídas a

carotenos com nove ligações duplas conjugadas. Comparação entre o espectro Raman da fração F5 (bandas em 1521, 1157 e 1010 cm^{-1}) e o espectro eletrônico (bandas em 425, 449 e 474 nm) confirmam o β -caroteno no extrato. Na fração F6, além da banda em torno de 1525 cm^{-1} , também se observa uma banda de $\nu(\text{C}=\text{C})$ em torno de 1545 cm^{-1} (Fig. 17), corroborando os dados do UV-vis que indica a presença do ζ -caroteno (425 ($\lambda_{\text{máx}}$) em mistura com o β -caroteno. A Fração F10 também possui uma mistura de componentes revelados pelo UV-Vis e bandas Raman bandas em torno de 1512 cm^{-1} e um ombro em torno de 1535 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$. Estas bandas foram atribuídas ao licopeno e neurosporeno (KOYAMA *et. al.* 1988), contendo 11 e 9 ligações duplas conjugadas, respectivamente (Tabelas 6 e 7, Fig. 17).

Figura 17- Espectros Raman das frações obtidas através do extrato etéreo (E3, E4 e E5) cromatografado em coluna aberta, com *laser* operando em 1064 nm.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*banda em 1460 cm^{-1} referente ao solvente.

Tabela 7- Principais bandas Raman (cm^{-1}) e comprimento de onda de máxima absorção das frações analisadas.

	Raman			UV-Vis
	$\nu_1(\text{C}=\text{C})$	$\nu_2(\text{C}-\text{C})$	$\rho(\text{CH}_3)$	$\lambda_{\text{máx}}$
F1	1668; 1633	-	-	285
F2	1670; 1637; 1577	-	-	347
F4	1525	1159	1007	444
F5	1521	1157	1010	449
F6	1545; 1525	1159	1007	425
F7	1525	1159	1007	422
F8	1527	1157	1007	442
F10	1535; 1512	1157	1007	470

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Os resultados obtidos através das espectroscopias eletrônica e Raman sugeriram a presença dos carotenos fitoeno e fitoflueno nas frações F1 e F2, respectivamente, o β -caroteno na fração F5, ζ -caroteno em mistura com β -caroteno na fração F6 e o licopeno em mistura com o neurosporeno na fração F10.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS CAROTENOS FITOENO E FITOFLUENO

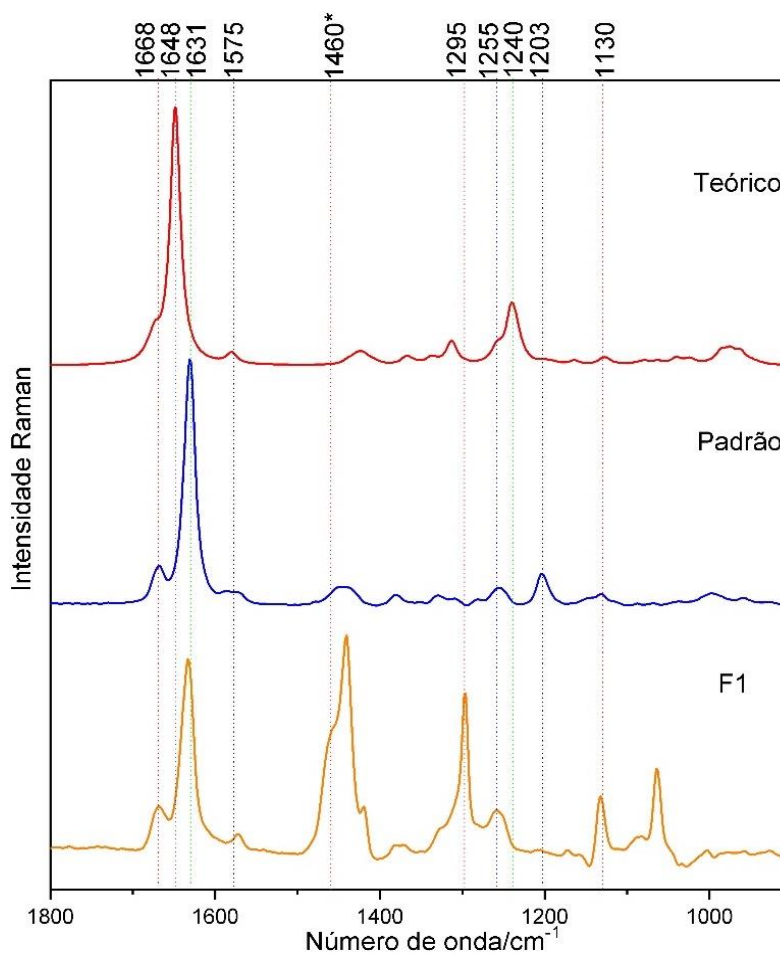
Com a finalidade de atribuir a bandas Raman do fitoeno e fitoflueno inequivocamente foram realizadas análises comparativas entre o espectro do *cis/trans*-fitoeno padrão e espectros obtidos através de cálculos de frequência vibracional pelo método DFT.

4.4.1 Fitoeno

O espectro do padrão de *cis/trans*- fitoeno foi comparado com o espectro obtido a partir do cálculo de estrutura eletrônica para a atribuição vibracional. A figura 18 mostra os espectros do padrão de *cis/trans*- fitoeno, espectro teórico, além do espectro da fração F1. O espectro teórico do fitoeno apresenta banda de estiramento C=C em 1673 e 1649 cm^{-1} , enquanto o padrão e a fração F1 possuem banda correlata em torno de 1668 e 1630 cm^{-1} . A banda referente ao

estiramento C-C no espectro teórico está em 1240 cm^{-1} , já no espectro do padrão em 1203 cm^{-1} , entretanto no espectro da fração F1 está ausente. A estrutura otimizada do fitoeno obtida após os cálculos encontra-se na figura 19. A tabela 8 mostra a tentativa de atribuição das bandas Raman do espectro teórico, do padrão *cis/trans*-fitoeno e da fração F1.

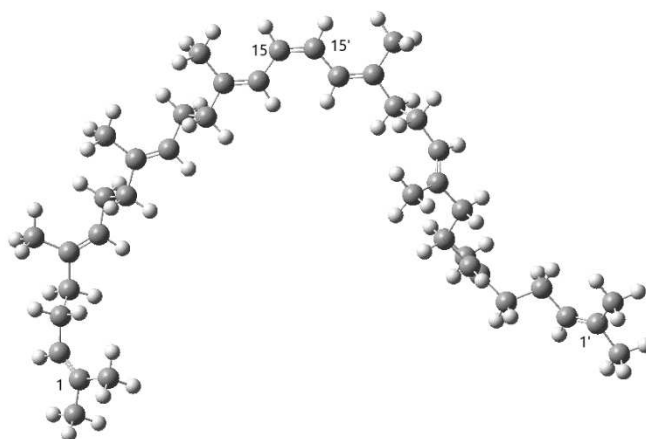
Figura 58- Espectros Raman do padrão de *cis/trans*- fitoeno, teórico e da fração F1, na região de 1800 a 800 cm^{-1} .



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*banda em 1460 cm^{-1} referente ao solvente.

Figura 19- Estrutura química otimizada do fitoeno.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 8- Tentativa de atribuição das bandas Raman do espectro teórico, do padrão de *cis/trans*- fitoeno e da fração F1 (cm^{-1}).

Teórico	Padrão	F1	Tentativa de atribuição
2930	2914 _f	-	νCH_3 ; νCH_2
2893	2861 _f	2883 _i	νCH_3 ; νCH_2
2876	-	2848 _i	νCH_2
1673	1668 _f	1668 _f	$\nu_s\text{C}=\text{C}$
1648	1631 _i	1633 _i	$\nu_s\text{C}=\text{C}$
1580	1575 _i	1573 _f	$\nu_{as}\text{C}=\text{C}$
1424	1448 _f	1440 _i	δCH_3
1313	-	1295 _i	$\delta\text{C-H}$; δCH_3
1256	1255 _f	1257 _f	$\delta\text{C-H}$
1240	1203 _f	-	$\delta\text{C}_{15}\text{-H}$; $\nu_s\text{C}_{15}\text{-C}_{14}$
1127	1132 _f	1132 _f	τCH_2 ; $\nu_s\text{C-C}$

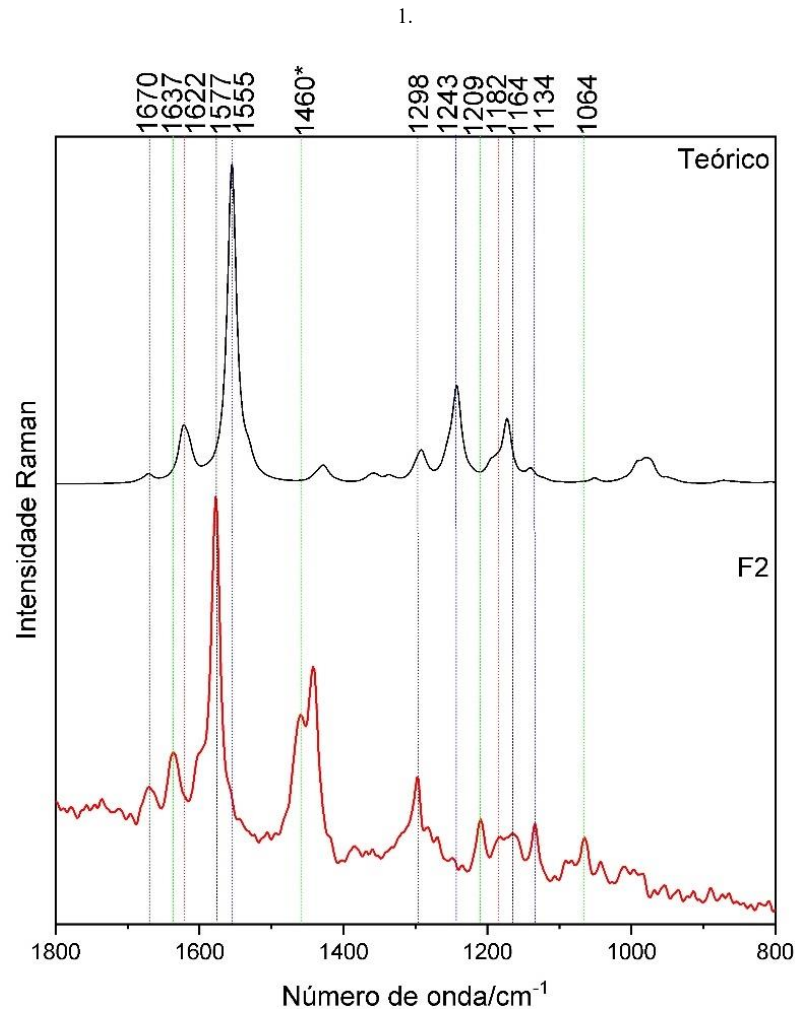
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Abrev.- i= intensa, f=fraca.

4.4.2 Fitoflueno

O espectro Raman teórico do fitoflueno juntamente com o espectro Raman da fração F2 podem ser observados na figura 20. O espectro teórico do fitoflueno apresenta bandas de estiramento C=C em 1668, 1622, 1555 cm^{-1} , já na fração F2, essas bandas são observadas em torno de 1670, 1637 e 1577 cm^{-1} , com a mesma relação das intensidades. A banda referente ao estiramento C-C no espectro teórico está em 1190 cm^{-1} , enquanto que no espectro da fração F2 está em 1182 cm^{-1} . A tentativa de atribuição das bandas Raman registradas no espectro teórico do fitoflueno e fração F2 encontra-se na tabela 9 e a estrutura otimizada do fitoflueno na Figura 21.

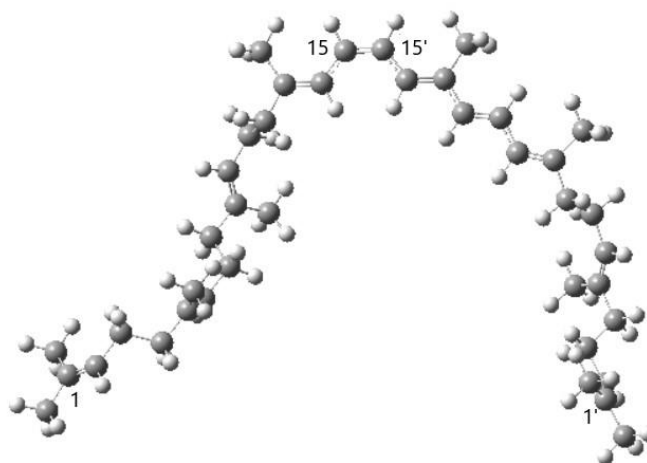
Figura 20- Espectros Raman teórico do fitoflueno e da fração F2, na região de 1800 a 800 cm^{-1} .



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

*banda em 1460 cm^{-1} referente ao solvente.

Figura 21- Estrutura química otimizado do fitoflueno.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 9- Tentativa de atribuição das bandas Raman do espectro teórico do fitoflueno e da fração F2 (cm^{-1}).

Teórico	F2	Tentativa de atribuição
2888	2883 _i	νCH_3 ; νCH_2
2841	2852 _i	νCH_3 ; νCH_2
1668	1670 _f	$\nu_s\text{C}=\text{C}$
1622	1637 _f	$\nu_s\text{C}=\text{C}$
1555	1577 _i	$\nu_s\text{C}=\text{C}$
1428	1442 _m	δCH_3 ; δCH_2
1292	1298 _f	δCH ; δCH_2
1243	1209 _f	$\delta\text{C}_{15}\text{H}$
1190	1182 _f	δCH_2 ; $\nu_s\text{C}_{14}-\text{C}_{15}$
1173	1164 _f	ρCH ; $\nu_s\text{C}-\text{C}$
1140	1134 _f	τCH_2 ; $\nu_s\text{C}-\text{C}$
1051	1064 _f	τCH_2

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Abrev.- i= intensa, m= media, f=fraca.

Os dados obtidos a partir da espectroscopia Raman e cálculo de estrutura de eletrônica pelo método DFT permitiu a caracterização dos carotenos fitoeno e fitoflueno ainda não

descritos na literatura. Os resultados mostraram que as espectroscopias Raman associada ao UV-Vis foram adequadas para identificação dos principais carotenos biossintetizados durante o processo maturação.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a espectroscopia Raman pode ser aplicada com sucesso na identificação de carotenoides diretamente na pele do tomate, ou seja, sem qualquer preparação preliminar da amostra. Os espectros Raman obtidos das amostras em diferentes estágios de maturação, mostraram bandas majoritárias atribuídas a compostos fenólicos e carotenoides contendo de 7, 9 e 11 insaturações conjugadas. Carotenos com menor número de insaturações previstos na rota biossintética, não foram identificados através das análises *in situ* devido a uma possível sobreposição dos sinais atribuídos aos fenólicos. As análises espectrais também mostraram variações na composição e distribuição dos carotenoides ao longo do processo de maturação. A intensidade das bandas Raman atribuídas aos diferentes carotenos varia entre os estágios de maturação. Os intermediários contendo N=7 parecem ser acumulados a partir do estágio E2 e se mantém até o amadurecimento total do tomate (E6) caracterizado pela presença de caroteno com N=11 (ex. licopeno). Carotenos cíclicos com N=9 (p.ex. β -caroteno) foram observados desde os estágios iniciais, embora sejam biossintetizados em etapa posterior aos carotenos com N=11. A distribuição de cada caroteno em diferentes locais da pele não foi homogênea nas amostras analisadas, mostrando alternância de pigmentos independente do estágio de maturação.

Os carotenos identificados pela espectroscopia Raman *in situ* (sem tratamento) foram caracterizados a partir da análise cromatográfica em coluna aberta das frações eluídas com diferentes gradientes de solventes. A caracterização dos carotenos fitoeno, fitoflueno, β -caroteno, ζ -caroteno, neurosporeno e licopeno foi feita através das espectroscopias Raman e UV-Vis. A confirmação das bandas Raman atribuídas ao fitoeno e fitoflueno foram feitas por comparação com espectros teóricos obtidos pelo método DFT, além de comparação com espectro do *cis/trans*-fitoeno padrão.

O conjunto dos dados tem como finalidade ampliar e divulgar o estudo sobre carotenos presentes nos diferentes estágios de maturação dos tomates através da espectroscopia Raman, além da caracterização dos espectros Raman de importantes precursores dos carotenoides, o fitoeno e fitoflueno. Este trabalho mostra a utilização da técnica como ferramenta de caracterização de precursores biossintéticos a partir das bandas Raman marcadoras que ocorrem em regiões específicas do espectro vibracional, em especial, a de estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$, uma vez que é a mais sensível a variação do número de ligações duplas conjugadas presentes nos carotenoides.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, R.; TUNG-CHING LEE; LOGENDRA, L.; JANES, H. correlation of lycopene measured by hplc with the l*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1697–1702, 2000.
- BARNARD, W.; De WAAL, D. Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix. **Journal Raman Spectroscopy**, v. 37, p. 342-352, 2006.
- BOILEAU, T. W.; LIAO, Z.; KIM, S.; LEMESHOW, S.; ERDMAN, J. W. Jr; CLINTON, S. K. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 96, nº 7, 2004.
- CALVO, M. M.; DADO, D.; SANTA-MARÍA, G. Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. **Eur Food Res Technol, Madrid**, v. 224, p. 567-571, 2006.
- CAMPBELL, J. K.; ENGELMANN, N. J.; ANN LILA, M.; ERDMAN, J. W. Jr. Phytoene, phytofluene, and lycopene from tomato powder differentially accumulate in tissues of male Fisher 344 rats. **Nutrition Research, Amsterdam**, v. 27, p. 794-801, 2007.
- CASTRO, Harlem Vieira. **Estudo vibracional de carotenóides em Amostras Biológicas e em Complexos de inclusão de ciclodextrinas**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.
- CAZZONELLI, C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, Australia, v. 38, p. 833-847, 2011.
- CLARK, R.J.H.; HESTER, R.E.; (eds). **Spectroscopy of Advanced Materials**. p. 19, 1991.
- FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G.; LE HYARIC, M.; OLIVEIRA, V. E. de, EDWARDS, H. G. M.; LIVEIRA, L. F. C. de. Raman spectroscopic investigation of carotenoids in oils from Amazonian products. **Spectroscopy Letters**, London, v. 46, p. 122-127, 2013.
- FRASER, P. D.; TRUESDALE, M. R.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development evidence for tissue-specific gene expression. **Plant Physio**, London, v.105, p. 405–413, 1994.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS,

R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Wallingford - CT: Gaussian Inc, 2009.

GENTILI, A.; DAL BOSCO, C.; FANALI, S.; FANALI, C. Large-scale profiling of carotenoids by using non aqueous reversed phase liquid chromatography – photodiode array detection – triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry: Application to some varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Rome, v. 164, p. 759–767, 2019.

HAMAUZU, Y.; CHACHIN, K.; UEDA, Y. Effect of Postharvest Storage Temperature on the Conversion of ¹⁴C-Mevalonic Acid to Carotenes in Tomato Fruit. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v. 67, p. 549-555, 1998.

HARA, R.; ISHIGAKI, M.; KITAHAMA, Y.; OZAKI, Y.; GENKAWA, T. Excitation wavelength selection for quantitative analysis of carotenoids in tomatoes using Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 258, p. 308–313, 2018.

IUPAC (U.S.A.). IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNO) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Tentative rules for the nomenclature of carotenoids. **The Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 247, n. 9, p. 2633-2643, 1972.

JENTZSCH, P.V.; CIOBOTA, V. Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils. **Wiley Online Library: Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, p.287-295, 2014.

KARAMPELAS, E.; FRITSCH, J. Y.; MEVELLEC, J. P.; GAUTHIER, S.; SKLAVOUNOS; SOLDATOS, T. Determination by Raman scattering of the nature of pigments in cultured freshwater pearls from the mollusk *Hyriopsis cumingi*. **Journal Raman Spectroscopy**, v.38, p. 217–230, 2007

KOTAKE-NARA, E.; KUSHIRO, M.; ZHANG, H.; SUGAWARA, T; MIYAHITA, K; NAGAO, A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. **The Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 131, p. 3303-3306, 2001.

KOYAMA, Y.; KANAJI, M.; SHIMAMURA, T. Configurations of neurosporene isomers isolated from the reaction center and the light-harvesting complex of *Rhodobacter spheroides* G1C. A resonance Raman, electronic absorption, and ¹H-NMR study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, p. 107-114, 1988.

KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. Tomatine, chlorophyll, b-carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Germany, v. 83, p. 195–200, 2003.

LAGORIO. **Guide to Ripening Stages**. Lagorio Family of Companies. Stockton, 2013. Disponível em: <http://www.lagorio.com/assets/pdf/lagorio-tomato-guide.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2019.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology, **Annual reviews Physiology**, Palo Alto, v. 68, p. 53-78, 2006.

LIAAEN-JENSEN, Carotenoids- a chemosystematic approach. **Pure & Applied Chemistry**, Great Britain, v. 51, p. 661-675, 1991.

LIAAEN-JENSEN. Carotenoids of lower plants-recent progress. **Pure & Applied Chemistry**, Great Britain, v. 57, p. 649-658, 1985.

MACHADO, N. F. L.; BATISTA DE CARVALHO, L. A. E.; OTERO, J.C.; MARQUES, M. P. M. A. Conformational study of hydroxyflavones by vibrational spectroscopy coupled to DFT calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Coimbra, v. 109, p. 116–124, 2013.

MAIA, L. F.; OLIVEIRA, V. E. de; OLIVEIRA, L. F. C. de. **Química de substâncias bioativas: obtenção e análise. Espectroscopia Raman de políenos conjugados**. Editora UFJF, p. 269-287, 2017.

MAIA, L. F.; OLIVEIRA, V. E. de; OLIVEIRA, M. E. R.; REIS, F. D.; FLEURY, B. G.; EDWARDS, H. G. M.; OLIVEIRA, L. F. C. de. Colour diversification in octocorals based on conjugated polyenes: a Raman spectroscopy view. **Journal of Raman Spectroscopy**, [s.l.], v. 44, p. 560-566, 2013.

MARTIN, D.; GONZALVEZ, A. G.; MEDINA, R. M.; UREÑA, A. G. Modeling tomato ripening based on carotenoid Raman spectroscopy: experimental versus kinetic model. **Applied Spectroscopy**, Spain, v. 71, p. 1310-1320, 2016.

MARTIN, D.; GONZALVEZ, A. G.; MEDINA, R. M.; URENA, G. A. Modeling tomato ripening based on carotenoid raman spectroscopy: experimental versus kinetic model. **Applied Spectroscopy**, vol. 71, p. 1310–1320, 2017.

MARTINEZ, A. Donator acceptor map of Psittacofulvins and Anthocyanis; are they good antioxidante substances? **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 113, p. 4915-4921, 2009.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-GIRONE'S, M. A.; BARBOSA, A.; COSTAS, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonina and vitamins. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 112, p. 9037-9042, 2008.

MARTÍNEZ, A.; STINCO, C. M.; MELENDEZ-MARTÍNEZ, A. J. Free radical scavenging properties of phytofluene and phytoene isomers as compared to lycopene: a combined experimental and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 118, p. 9819-9825, 2014.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; MAPELI-BRAHM, P.; BENÍTEZ-GONZÁLEZ, A.; STINCO, C. M. A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Spain, v. 572, p. 188-200, 2015.

- MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H.; TRUSCOTT, T. G. The interaction of Dietary Carotenoids with Radicals Species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p.13-19, 2001.
- MORELLI, R.; LOSCALZOO, R.; STRADI, R.; BERTELLI, A.; FALCHI, M. Evaluation of the antioxidante activity of new carotenoi-like compounds by eletron paramagnetic rressonance. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, Switzerland, v. XXIX, p. 95-100, 2003.
- OLIVEIRA, L. F. C. de; DANTAS, S. O.; VELOZO, E. S.; SANTOS, P. S.; RIBEIRO, M. C. C. Ressonance Raman investigation and semi-empirical calculation of the natural carotenoid bixin. **Journal Molecular Structure**, Amsterdam, v. 435, p. 101-107, 1997.
- OLIVEIRA, V. E. de; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; OLIVEIRA, L. F. C. de. Carotenes and carotenoids in natural biological samples: A Raman spectroscopic analyses. **Journal of Raman Spectroscopy**, Hoboken, v. 41, p. 642-650, 2010.
- PAIVA; S. A. R.; RUSSEL, R. M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American college of Nutrition**, New York, v. 18, p. 426-433, 1999.
- PERVEEN, R; SULERIA, H. A. R.; ANJUM, F. M.; BUTT, M. S.; PASHA, I.; AHMAD, S. Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims-a comprehensive review. **Food Science and Nutrition**, v. 55:7, p. 919-929, 2013.
- PINI, E.; BERTELLI, A.; STRADI, R.; FALCHI, M. Biological activity of parrodienes, a new class of plyunsaturated linear aldehydes similar to carotenoids. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, Switzerland, v. XX, p. 203-206, 2004.
- POLYAKOV, N. E.; LESHINA, T. V.; KONOVALONA, T. A.; KISPERT, L. D. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology & Medicine**, Amsterdam, v. 31, p. 398-404, 2001. *et al.*, 2001.
- RODRIGUEZ – AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington, DC: Ilsi Press, 2001.
- ROMERO, F; FERNANDEZ-CHIMERO, R. I.; FUENTE, J. L. DE LA; BARREDO, J. L. Selection and taxonomic identification of carotenoid-producing marine actinomycetes. **Methods in Molecular Biology**, Heildeberg, v. 892, p. 13-20, 2012.
- SAITO, S.; TASUMI, M. Normal-Coordinate analysis of β -carotene isomers and assignments of the raman and infrared bands. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 14, n^o. 5, 1983.
- SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Unesp, 2008. ISBN 9788571398689.
- SCHAFFER, H. E.; CHANCE, R. R.; SILBEY, R. J.; KNOLL, K.; SCHROCK, R. R. Conjugation length dependence of Raman scattering in a series of linear polyenes: Implications for polyacetylene. **The Journal of Chemical Physics**. Germany, v, 94, p. 4161-4170, 1990.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopic. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 43, p. 13-25, 2007.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M.; BARANSKI, R. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. **Biopolymers**, v. 77(4), p. 212–221, 2005.

SCHURGEL, F. B.; KUZMANY, H. Optical modes of trans-polyacetylene. **Journal of Chemical Physics**, v. 74, p. 953-958, 1981.

SHUMSKAYA, M; WURTZEL, E. T. The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions. **Plant Science**, v. 208, p. 58-63, 2013.

STRADI, R.; BERTELLI, A.; PINI, E. Polyunsaturated linear aldehydes and their derivatives with anti-radical and anti-tumoral activity, US. **Patent 0175555 A1**, 2005a.

TAMASI, G.; PARDINI, A.; BONECHIL, C.; DONATIL, A.; PESSINA, F.; MAR-COLONGO, P.; GAMBERUCCI, A.; LEONE, G.; CONSUMIL, M.; MAGNANI, A.; ROSSIL, C. Characterization of nutraceutical components in tomato pulp, skin and locular gel. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 907–918, 2019.

TESLOVA, T.; CORREDOR, C.; LIVINGSTONE, R.; SPATARU, T.; BIRKE, R. L.; LOMBARDI, J. R.; CAÑAMARES, M. V.; LEONA, M. Raman and surface-enhanced Raman spectra of flavone and several hydroxy derivatives. **Journal Raman Spectroscopy**, New York, v. 387, p. 802-818, 2007.

APENDICE A- Súmula curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Toledo Clemente Campos

Local e data de nascimento: Juiz de Fora- MG, 31 de março de 1994.

EDUCAÇÃO

Colégio Professor Ricardo Musse, Juiz de Fora- MG, 2009-2011. Ensino Médio.

Universidade Federal de Juiz de Fora – MG- Graduação em bacharelado em Química, 2013-2017.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CAPES 08/2018- 03/2020.

PUBLICAÇÕES E APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS EM CONGRESSOS

GARCIA, HUMBERTO C.; CAMPOS, MARIANA T.C.; EDWARDS, HOWELL G.M.; OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. de. Vibrational and structural properties of barbiturate anions in supramolecular compounds. **Vibrational spectroscopy**, v. 86, p. 134-142, 2016. (Publicação/ Apresentação de trabalho/ Congresso).

BEHRENS, D. M.; MAIA, L. F.; CAMPOS, M. T. C.; OLIVEIRA, L. F. C.; MORAGAS, C.; CHAGAS, M. Raman spectroscopy as a tool in the characterization of flavonoids and carotenoids from leaves of *arrabidaea chica*. 2017. (Apresentação de Trabalho/ Congresso).

CAMPOS, M. T. C.; MAIA, L. F.; OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate. 2018. (Apresentação de Trabalho/ Congresso).

ANEXO A – Relação do número de ligações conjugadas com o $\nu(\text{C}=\text{C})$

A tabela a seguir apresenta a relação entre a banda referente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ com o número de ligações conjugadas em uma cadeia poliênica.

Tabela 10- Correlação entre do número de ligações duplas conjugadas de polienos com a posição da banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ (cm^{-1}).

Número de conjugações	BARNARD; DE WAAL, 2006.	SCHAFFER, 1990.	SCHUGERL; KUZMANY, 1981.
3	1638,4	1638,5	1639,0
4	1610,4	1613,8	1609,0
5	1588,8	1587,3	1579,0
6	1571,1	1570,6	1561,9
7	1556,1	1555,6	1549,0
8	1543,2	1542,2	1539,0
9	1531,7	1530,9	1531,0
10	1521,5	1520,9	1524,5
11	1512,2	1514,0	1519,0
12	1503,8	1505,9	1514,4
13	-	-	1510,4
14	-	-	1507,0
15	-	-	1504,0
16	-	-	1501,4

Fonte: Adaptado de Karampelas *et al* (2007).