Izolacija karotenoida

Horvat, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:067099

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Odjel za kemiju

Prediplomski studij kemije

Monika Horvat

Izolacija karotenoida

Završni rad

Mentor: izv.prof.dr.sc. Spomenka Kovač

Osijek, 2012

SADŽAJ

1. SAŽETAK 2

2. UVOD 3

3. GLAVNI DIO 4

3.1. BIOSINTEZA TERPANA I PREDSTAVNICI TERPENA 4

3.2. TETRATERPENI 9

3.3. KONVERZIJA β-KAROTENA U VITAMIN A 13

3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KAROTENOIDA 14

3.5 BOJA TVARI I VIDLJIVI SPEKTAR 16

3.6. METODE PRIMJENJENE U IZOLACIJI I DOKAZIVANJU PIGMENATA 17

3.6.1. EKSTRAKCIJA 17

3.6.2. KROMATOGRAFIJA NA STUPCU 18

3.6.3. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA 20

3.7. MATERIJALI I METODE 22

3.7.1. MATERIJALI 22

3.7.2. METODE 22

4. REZULTATI I RASPRAVA 26

5. ZAKLJUČAK 29

6. LITERATURA 30

1. SAŽETAK

U prirodi se javlja mnogo obojenih tvari čija se boja temelji na apsorpciji djela vidljivog spektra sustavom konjugiranih veza. Narančasti i crveni pigmenti u voću i povrću su ugljikovodici pod nazivom karotenoidi. Boju karotenoida ne čini jedan spoj, već smjesa spojeva. Zadatak ovog rada bila je izolacija i identifikacija karotenoida iz mrkve, rajčice, svježe i mljevene paprike. Za identifikaciju spojeva koji se nalaze u ovom povrću korištena je tankoslojna kromatografija dok je za pročišćavanje korištena kromatografija na stupcu. Kloroform, koji je nepolarno otapalo, korišten je u postupku izolacije. Kromatogram je razvijen u kloroformu, a za kolonsku kromatografiju je korištena smjesa otapala aceton : petroleter u volumnom omjeru 10:90. Kod dobivenih rezultata vidi se da mljevena i svježa paprika sadrže iste karotenoide. Vidljivo je da mrkva sadrži smjesu karotena, α-karoten, β-karoten i γ-karoten. Rajčica sadrži likopen i β-karoten i neke ksantofile, žuto obojene karotenoide.

ABSTRACT

In nature occurs a lot of colored substences which color is based on absorption of visible spectrum by conjugated system. Orange and red pigments in fruits and vegetables are hydrocarbons called carotenoids. Carotenoids color does not make one compound, but a mixture of compounds. Carotenoid in carrot, tomato and fresh and ground pepper are isolated and identified. For identification of carotenoid in vegetables was used thin layer chromatography (TLC) and for purification column chromatography. Chloroform, which is a non polar solvent, were used in the proces of isolation. As mobile phase in TLC was used chloroform and for column chromatography was used a mixture of solvents of aceton:petroleum ether in volume ratio 10:90. As the result is shown that fresh and ground pepper contain the same carotenoid. Mixture of carotens was found in carrot, α-caroten, β-caroten and γ-caroten. Tomato contains lycopene and β-caroten and some xantophyls, yelow colored carotenids.

Ključne riječi:

Karotenoidi, terpeni, izolacija, tankoslojna kromatografija, kromatografija na stupcu

Key words:

Carotenoids, terpenes, isolation, thin layer chromatography, column chromatography

2. UVOD

Karotenoidi su već stoljećima zanimljivi za istraživanje u mnogim znanstvenim područjima kao što su kemija, biokemija, biologija, prehrambena znanost i tehnologija, medicina, farmacija i nutricionizam, a i dalje se intenzivno istražuju. Široko su rasprostranjeni prirodni pigmenti odgovorni za žutu, narančastu, crvenu boju voća, povrća, cvijeća, riba, ptica, bezkralježnjaka. Oni se u pravilu javljaju u kloroplastima viših biljaka iako je u tim fotosintetskim tkivima njihova boja prekrivena klorofilom. Pronađeni su i u algama, bakterijama, plijesnima i u kvascima. Osnovna struktura karotenoida je simetrični, linearni tetraterpen koji sadrži 40 ugljikovih atoma. Lanac je sagrađen od osam izoprenskih jedinica. Osnovna struktura može biti promijenjena različitim reakcijama, kao što su hidrogenacija, dehidrogenacija, izomerizacija, ciklizacija, pregradnja dvostrukih veza, skraćivanje ili produživanje lanca. Izolirano je i opisano više od 600 prirodnih karotenoida. Ugljikovodični karotenoidi se zajedno zovu karoteni, a oni koji sadrže kisik zovu se ksantofili. Najčešća funkcionalna skupina je hidroksilna skupina. Pronađene su i aldehidna skupina, keto skupina, karboksilna skupina, metoksi skupina. Karotenoidi, bilo karoteni ili ksantofili, mogu biti aciklički, monociklički ili biciklički. Ciklizacija se javlja na jednom ili oba kraja molekule stvarajući jedan ili dva šesteročlana prstena. [1]

Voće i povrće sadrži najviše karotenoida u ljudskoj prehrani. α-Karoten, β-karoten, β-kriptoksantin, lutein, likopen i zeaksantin su najčešći u ljudskoj prehrani. α-Karoten, β-karoten i β-kriptoksantin su provitamini vitamina A, što znači da mogu biti pretvoreni u retinol u ljudskom tijelu. [2]

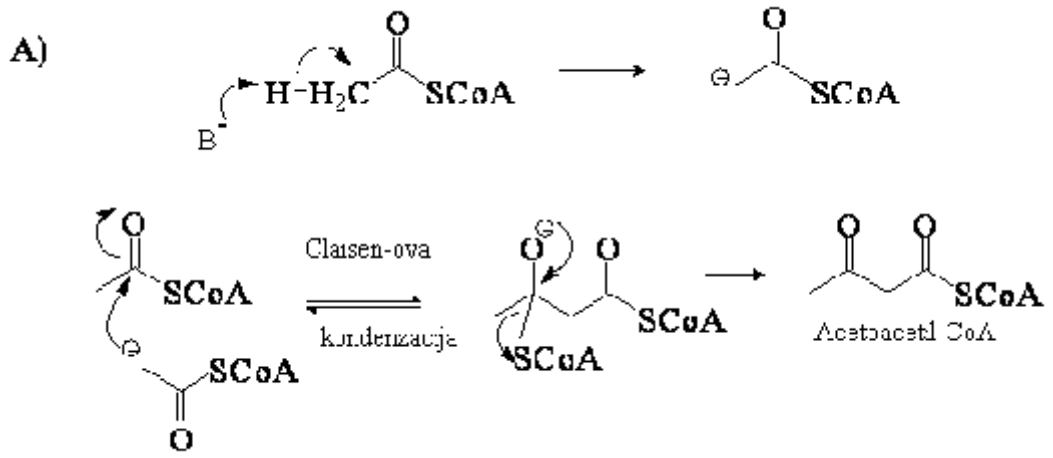
Zadatak ovog rada je izolacija i identifikacija karotenoida iz mrkve, rajčice, svježe i mljevene paprike. U glavnom djelu ukratko je opisana biosinteza terpena, konverzija β-karotena u vitamin A, antioksidacijska aktivnost karotenoida, nekoliko rečenica posvećeno je tetraterpenima, boji i vidljivom spektru, opisane su i metode koje su primijenjene u izolaciji i dokazivanju pigmenata, te materijali i metode.

3. GLAVNI DIO

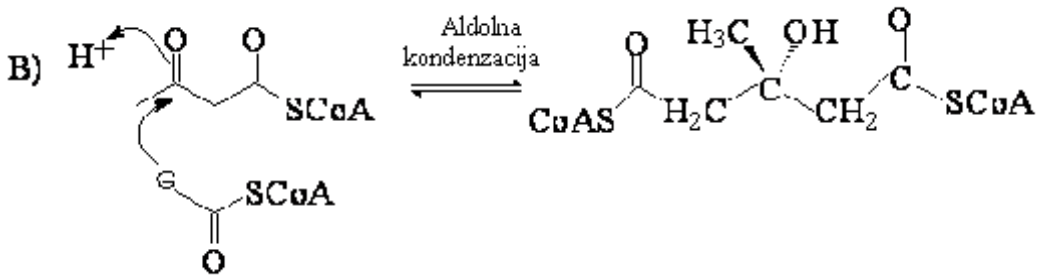
3.1. BIOSINTEZA TERPENA I PREDSTAVNICI TERPENA

Terpeni su polimeri čija biosinteza počinje od acetil-CoA iz kojeg pomoću enzima nastaje osnovna C-5 jedinica. U laboratorijskim uvjetima zagrijavanjem izoprena dolazi do Diels – Alderove reakcije (1,4 – adicija jedne dienske molekule na 1,2 – položaj druge pri čemu nastaje dipenten). [3]

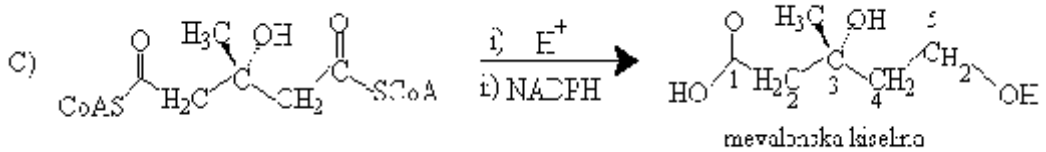
Prekursorska jedinica u biosintezi terpena je octena kislina. Svi stupnjevi biosinteze su katalizirani enzimima specifičnim za taj biokemijski proces. Dvije se molekule acetata prisutne kao tioesteri koenzima A povezuju Claisenovom kondenzacijom i daju fragment sa četiri ugljikova atoma (slika 1). Tada se adira treća molekula acetil-CoA reakcijom aldolne kondenzacije dajući razgranati skelet od šest ugljikovih atoma koji je srodan mevalonskoj kiselini (slika 2). Redukcijom jedne karboksilne kiseline s NADPH i hidrolizom druge tioesterske skupine nastaje mevalonska kiselina, (slika 3), koja se fosforilira pomoću ATP-a, a zatim dekarboksilira dajući 3-izopentenil-pirofosfat. Monoterpeni nastaju dimerizacijom izoprenskih jedinica. Dimerizaciju omogućuje premještanje dvostruke veze u nekim molekulama 3-izopentenil-pirofosfata s položaja 3 na položaj 2. 2-izopentenil-pirofosfat je alilni fosfat pa je stoga i reaktivniji prema nukleofilima nego njegov prekursor. Nukleofilnom supstitucijom sa π-elektronima 3-izopentenil-pirofosfata na terminalnom ugljikovom atomu 2-izopentenil-pirofosfata nastaje geranil-pirofosfat koji je perkursor geraniola i svih ostalih monoterpena. Seskviterpeni i diterpeni nastaju daljnom adicijom jedne ili dviju izopentenilnih skupina na geranil-pirofosfat. Triterpeni i tetraterpeni ne nastaju daljnim povezivanjem C_5-jedinica na način „glava-rep“. Umjesto toga dva se seskviterpena ili diterpena vežu načinom“rep-rep“. [3]



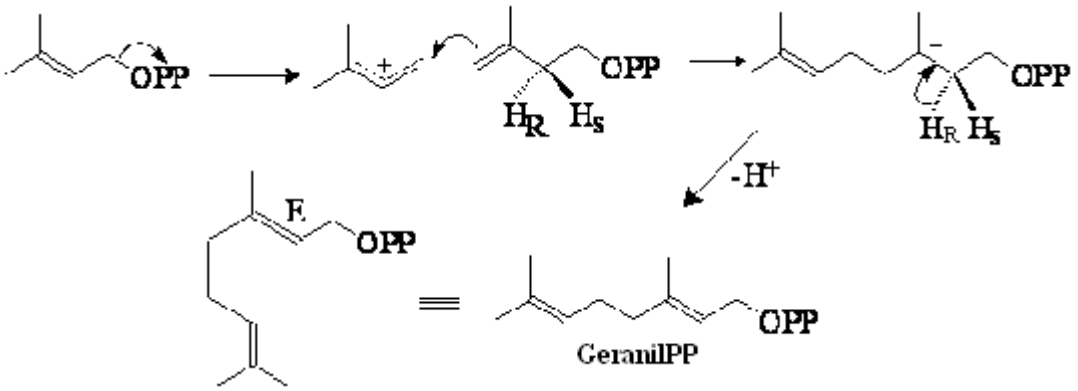
Slika 1. Claisen-ova kondenzacija



Slika 2. Aldolna kondenzacija



Slika 3. Redukcija pomoću NADPH

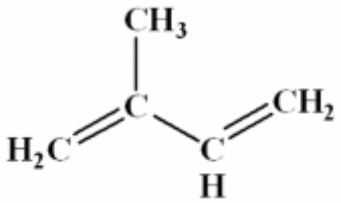


Slika 4. Nastajanje geranil-pirofosfata

Klasifikacija terpena se temelji na izoprenskom pravilu prema broju izoprenskiih jedinica:

Hemiterpeni C_5H_8

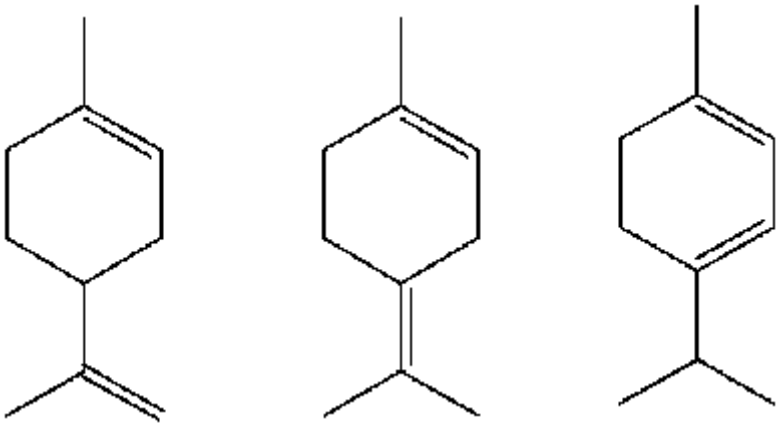
Hemiterpeni su terpeni sastavljeni od samo jedne izoprenske jedinice. Najpoznatiji hemiterpen je sam izopren. [6]



Slika 5. Struktura izoprena

Monoterpeni $(C_5H_8)_2$

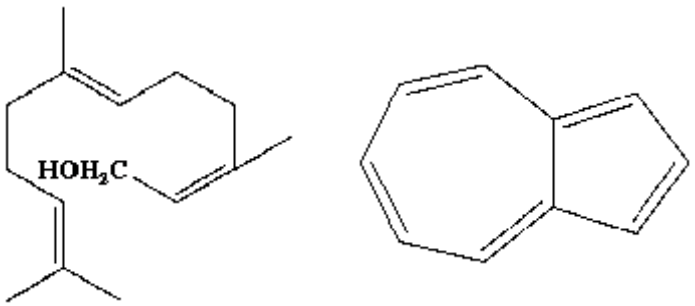
Monoterpeni su vrsta terpena koji su sastavljeni od dvije izoprenske jedinice. Široko su rasprostranjeni u prirodi, posebice u esencijalnim uljima. Važni su u parfumeriji i industriji mirisa. Pronađeni su u morskim organizama.[6]



Slika 6. Strukture monoterpena: limonena, terpinolena i terpinena

Seskviterpeni $(C_5H_8)_3$

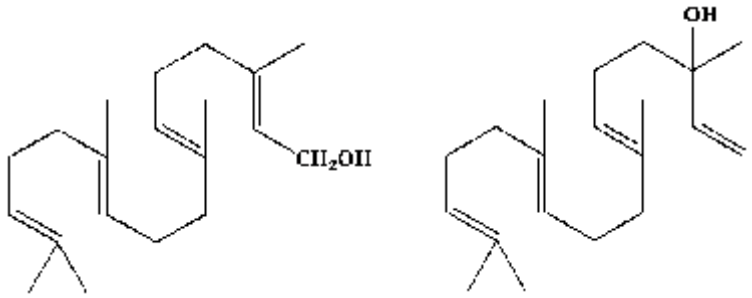
Sadrže tri izoprenske jedinice. Pronađeni su u živom sustavu viših biljaka. Nastaju iz zajedničkog prekursora, farnezil pirofosfata, pomoću različitih metoda ciklizacije praćenih u mnogim slučajevima pregradnjom ugljikova kostura.[6]



Slika 7. Strukture seskviterpena: farnezola i azulena

Diterpeni $(C_5H_8)_4$

Diterpeni su terpeni koji sadrže dvadeset ugljikovih atoma u osnovnom skeletu, sačinjenom od četiri izoprenske jedinice. Nastali su od geranilgeranil-pirofosfata. Pojavljuju se u gotovo svim biljkama lončanicama. [6]



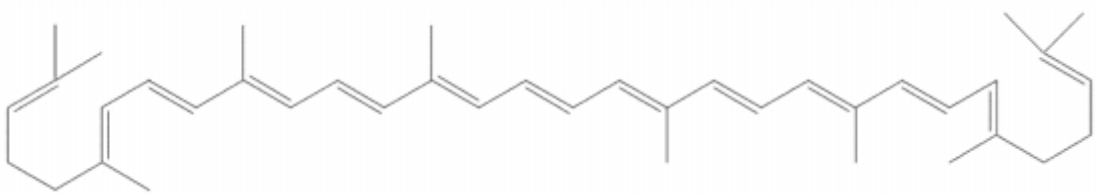
Slika 8. Strukture diterpena: geranilgeraniola i geranillinalola

Triterpeni $(C_5H_8)_6$

Triterpeni su spojevi koji sadrže trideset ugljikovih atoma sačinjenih od šest izoprenskih jedinica. Vjeruje se da oni potječu od skvalena koji nastaje spajanjem dvije seskviterpenske jedinice. Mogu biti tetraciklički i pentaciklički. [6]

Tetraterpeni $(C_5H_8)_8$

Pripadaju skupini karotenoida. Sadrže osam izoprenskih jedinica. Nastaju spajanjem dviju geranilgeranil-pirofosfat molekula koje se međusobno vežu *rep na rep* pri čemu nastaje perfitoen-pirofosfat. Perfitoen-pirofosfat je prekursor karotenoida. Do sada je poznato oko četristo vrsta karotenoida kojima je određena struktura. [6]



Slika 9. Struktura tetraterpena

3.2. TETRATERPENI

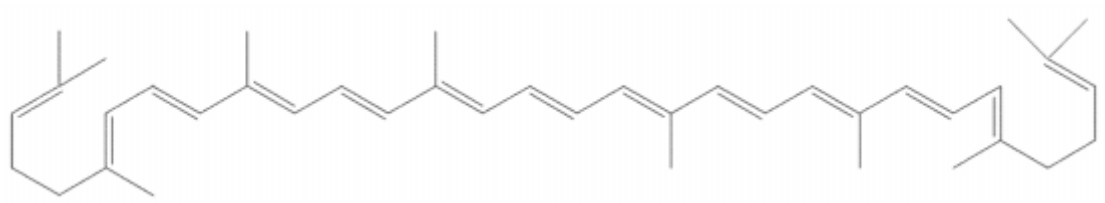
Karotenoidi su žuti, narančasti ili crveni pigmenti. Čine boju mnogih plodova voća, povrća, cvijeća i lišća. Ima ih u jajima, algama i gljivama, te u boji perja mnogih ptica. Po kemijskoj strukturi, karotenoidi su tetraterpeni, a pripadaju lipidima. Najvažnija uloga karotenoida u prirodi je sudjelovanje u procesu fotosinteze. Nalaze se u kloroplastima gdje su vezani za bjelančevine. Zbog svoje polienske strukture vrlo su nestabilni pa se u prisustvu kisika i svjetlosti oksidiraju, cikliziraju i izomeriziraju.

Karotenoidi se mogu podjeliti u dvije skupine. Prvu čine karoteni (ugljikovodici) čija je jedna od osobina da se otapaju u nepolarnim otapalima. Druga skupina su ksantofili koji u svojoj strukturi sadrže kisik. Otapaju se u polarnim otapalima, a javljaju se kao alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri. Iz prirodnog se materijala izoliraju ekstrakcijom pomoću organskih otapala, u inertnoj atmosferi i bez prisustva svjetlosti pri čemu se proteinski dio denaturira. Ovako dobivena smjesa se razdvaja *Creig-ovom* metodom, koja se zasniva na različitoj topljivosti karotenoida u nepolarnim i polarnim otapalima. Pročišćavanje izoliranih frakcija izvodi se obično kromatografskim metodama. Najčešće se identificiraju karakterističnim maksimumima u vidljivom dijelu UV spektra. Za kvantitativno određivanje se koriste kolorimetrijske metode, jer karotenoidi daju plavu boju sa sumpornom kiselinom ili antimonovim (III)-kloridom u kloroformu kao otapalu.

Većina karotenoida ima centralni dio molekule u obliku dugačkog konjugiranog lanca. Krajevi molekule mogu biti otvoreni (alifatski) i ciklizirani.

Aciklički tetraterpen – Likopen ($C_{40}H_{56}$)

Likopen je crveni pigment iz zrele rajčice i iz lubenice. Katalitičkom hidrogenacijom veže trinaest molova vodika dajući zasićeni ugljikovodik perlikopen, $C_{40}H_{82}$. Perlikopen je sintetiziran Würtz-ovom reakcijom iz dva mola dihidrofitilbromida, pa je tako utvrđen ugljikov kostur. Ozonolizom likopena nastaju dva mola acetona, zajedno s levulinaldehidom, što označuje položaje dvostrukih veza.[10]

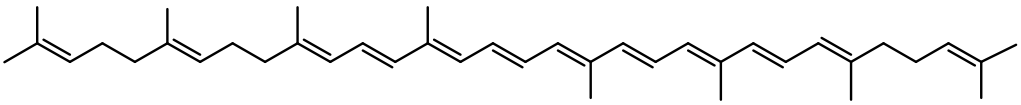


Slika 10. Kemijska struktura likopena

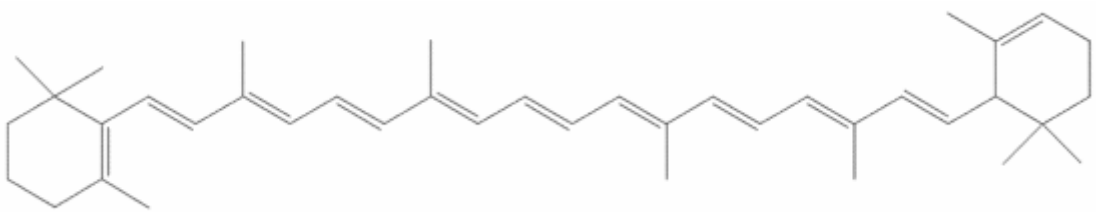
Monociklički i biciklički tetraterpeni

Primjenom kromatografske adsorpcije dokazano je da je karoten smjesa izomera. Do sada je identificirano šest karotena; α-karoten, β-karoten, γ-karoten, δ-karoten, ε-karoten, ζ-karoten. Posljednja tri su dokazana samo pomoću apsorpcijskih spektara, te su poznate strukture samo prva tri izomera.

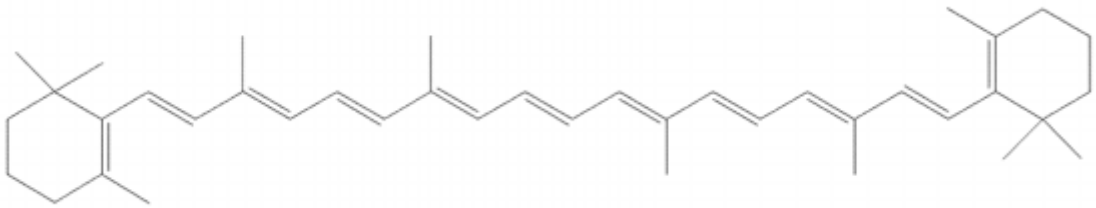
Ciklizacijom neurosporena nastaju prvo α- i β-zeakaroten iz kojih oksidacijom nastaje γ-karoten. Najvažniji biciklički karoteni (α- i β-karoten) nastaju iz γ-karotena. α-karoten ima samo jedan β-jononski prsten, dok je druga polovica α-jononskog tipa. Kod γ-karotena polovica molekule slična je β-karotenu, dok je druga polovica molekule nije ciklizirana kao u molekuli likopena [10].



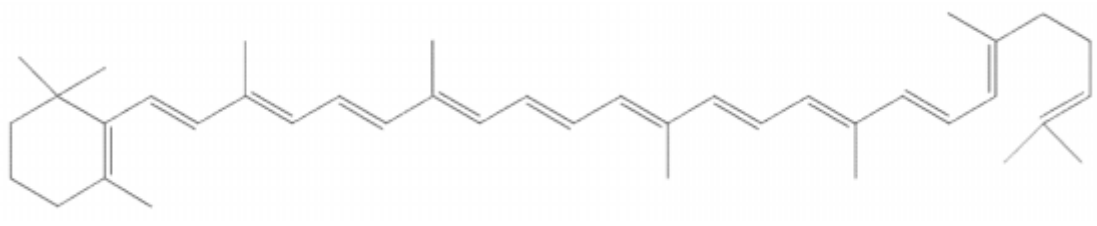
Slika 11. Kemijska struktura neurosporena [18]



Slika 12. Kemijska struktura α-karotena



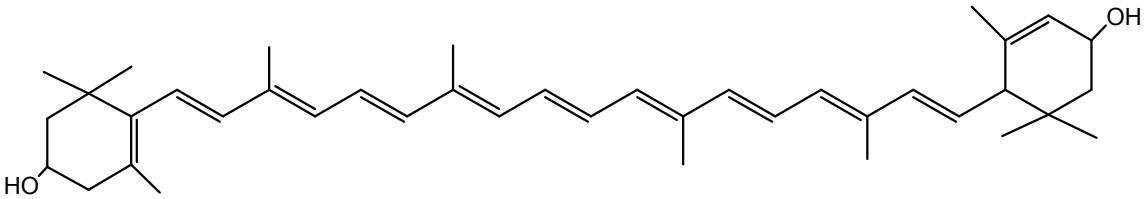
Slika 13. Kemijska struktura β-karotena



Slika 14. Kemijska struktura γ-karotena

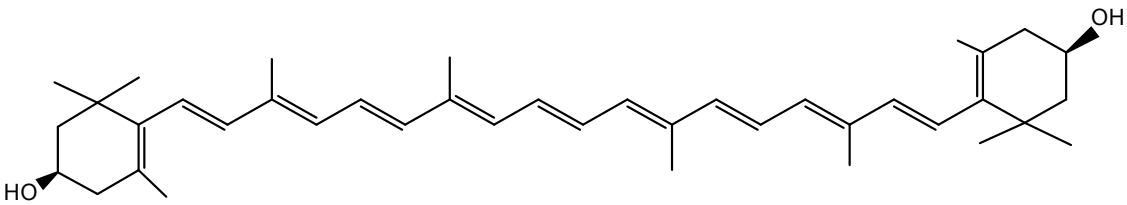
Uz karotene lišće sadrži i žute pigmente poznate kao ksantofile koji sadrže kisik u svojoj strukturi. Zajedno sa karotenima su uzrok jesenskog bojila lišća jer se zadržavaju nakon razgradnje zelenog klorofila. Kisik može biti prisutan u obliku jedne ili više hidroksilnih skupina, jedne ili više karboksilnih skupina ili hidroksilne skupine i karboksilne skupine. Hidroksilne skupine mogu biti esterificirane ili slobodne. Kisik može biti prisutan u obliku 1,2- ili 1,4-oksidnih prstena. [10]

Lutein $C_{40}H_{56}O_2$ dolazi u zelenom i žutom lišću, te u žutom cvijeću. Zajedno sa zeaksantinom čini pigment žumanjka. Utvrđeno je da je lutein hidroksi derivat β-karotena. [10]



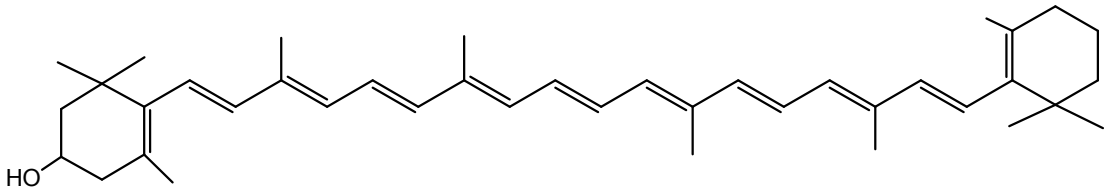
Slika 15. Kemijska struktura luteina

Zeaksantin $C_{40}H_{56}O_2$ je dihidroksi derivat β-karotena. Glavni je pigment žutog kukuruza *(Zea mays),* a u različitoj količini dolazi i u žumanjaku jajeta.[10]



Slika 16. Kemijska struktura zeaksantina

Kriptoksantin $C_{40}H_{56}O$ je monohidroksi derivat β-karotena. Nađen je slobodan i esterificiran u kukuruzu, mahunama, paprici, a glavni je pigment mandarina.[10]

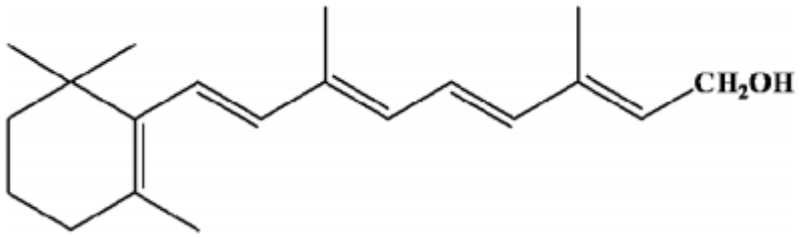


Slika 17. Kemijska struktura kriptoksantina

3.3. KONVERZIJA β-KAROTENA U VITAMIN A

Važnost karotenoida nije samo u funkciji pigmenta. Vitaminska aktivnost karotenoida poznate je duže vrijeme. Vitamin A je pronađen u hrani kao pro-vitamin A (retinil ester, retinal, retinol, 3-dehidroretinol i retinoična kiselina) od hrane životinskog podrijetla kao jetra, mlijeko i mliječni proizvodi, riba, meso ili kao karotenoidi koji mogu biti biološki pretvoreni u vitamin A. Na svjetskoj razini, 60% prehrambenih vitamina procjenjuje se da dolazi od provitamina. [1]

Vitamin A je lipofilni vitamin koji u hrani dolazi otopljen u mastima, namirnicama životinjskog podrijetla ili kao provitamin β-karoten u namirnicama biljnog podrijetla. Za konverziju provitamina A u aktivni vitaminski oblik potrebna je razgradnja α-karotena ili β-karotena pomoću sunčevih zraka, oksidacije na zraku ili termičke obrade hrane. [11]



Slika 18. Kemijska struktura vitamina A

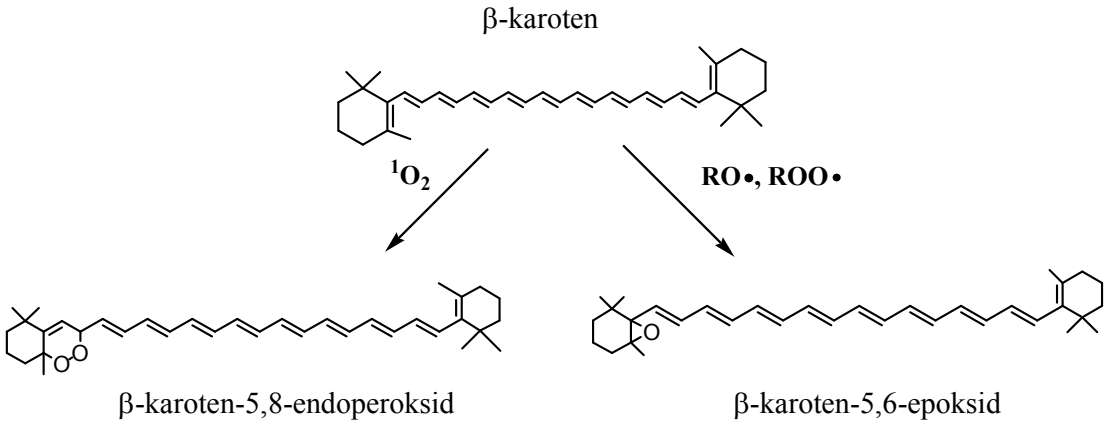
Kada bi β-karoten u sredini molekule reagirao s dvije molekule vode na taj način da izvrši cijepanje, pa dva centralna ugljikova atoma postanu primarne alkoholne skupine, nastale bi dvije molekule vitamina A. Probavni trakt i jetra životinjskog organizma u mogućnosti su izvršiti ovo cijepanje uz pomoć enzima 15,15'-monooksigenaze, pa zato β-karoten ima aktivnost vitamina A. Životinjski organizam ne može izomerizirati α-jononsku strukturu u β-jononsku, a ne može ni ciklizirati krajeve likopenskog lanca u β-jononski prsten. Zato je vitaminska aktivnost α-karotena i γ-karotena smanjena, dok je likopen potpuno neaktivan. Konverzija karotena u vitamin A nije 100%-tna, obično se od unesene količine samo jedna trećina unesenog karotena prevede u vitamin A. [10]

3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KAROTENOIDA

Antioksidansi su, po definiciji, sve one tvari koje u maloj količini u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanasa. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim stoga su sposobni oksidirati biološke molekule. Antioksidansi djeluju tako da: usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, štite od srčanog i moždanog udara, smanjuju rizik nastanka raka i suzbijaju rast tumora, pomažu detoksikaciju kancerogenih tvari, usporavaju napredovanje Alzheimerove bolesti, pružaju zaštitu od kroničnih plućnih bolesti kao što su astma, bronhitis i sl., te pružaju zaštitu od ekoloških zagađivača.

Ljudski organizam izložen je različitim vrstama oksidanasa sposobnim za razaranjem biološki važnih molekula kao što su DNA, proteini, ugljikohidrati i lipidi. Među različitim obrambenim strategijama karotenoidi su najvjerojatnije uključeni u ukljanjanje dviju od brojnih vrsta reaktivnih molekula, molekule singlet kisika ($^1O_2$) i peroksilnih radikala. [8]

Interakcija između $^1O_2$ i karotenoida ovisi o fizikalnom mehanizmu koji uključuje energiju koja se prenosi između dviju molekula. Energija se prenosi sa kisika na karotenoid koji se pobuđuje i zatim višak energije oslobađa u interakciji sa okolnim otapalom. Kako je ovo fizikalna promjena, struktura karotenoida se ne mijenja, pa mogu sudjelovati u više krugova neutralizacija $^1O_2$. Među brojnim karotenoidima, tako ksantofili kao i karoteni pokazali su se kao uspješni inhibitori oksidanasa. Inhibirajuća aktivnost karotenoida prvotno ovisi o broju konjugiranih dvostrukih veza u molekuli te utjecajem funkcionalnih skupina u karotenoidu (cikličkih ili acikličkih). Karotenoidi koji privlače radikale su pokazali visoku rezonancijsku stabilnost i predviđa se da su relativno nereaktivni. Likopen (jedanaest konjugiranih i dvije nekonjugirane dvostruke veze) je među najdjelotvornijim inhibitorima slobodnih radikala i oksidanasa među prirodnim karotenoidima. Među raznolikim radikalima koji nastaju u našem organizmu karotenoidi najuspješnije reagiraju sa peroksi radikalima. Oni nastaju u procesu peroksidacije lipida. Zbog lipofilnosti i specifičnih svojstava u neutralizaciji peroksi radikala karotenoidi igraju važnu ulogu u zaštiti staničnih membrana i lipoproteina od oksidacije. [8]



Slika 19. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja β-karotena

Dodatak β-karotena u prehrani dokazano povećava sadržaj β-karotena u koži miševa. Neka su istraživanja pokazala da dodatak β-karotena u hrani može inhibirati oksigenaciju $^1O_2$ nezasićenih lipida u koži miševa koji su izloženi UVA zračenju. Poznato je da je β-karoten-5,8-endoperoksid produkt oksidacije β-karotena specifičnom oksigenacijom $^1O_2$ dok je β-karoten-5,6-epoksid nastao radikalskom reakcijom kolesterola i izomerizacijom kolesterol-5,8-endoperoksida (slika 20). Istraživanja su pokazala da su β-karoten-5,8-endoperoksid i β-karoten-5,6-epoksid produkti oksidacije kolesterola u koži miševa. Jedna doza UVA zračenja na koži miševa povećala je ove produkte oksigenacije u usporedbi s miševima na kojima nije primijenjeno UVA zračenje. Ovo otkriće indicira da β-karoten može reagirati sa $^1O_2$ te slobodnim radikalima i proizvesti navedene produkte oksidacije u koži. Ovaj fenomen je indirektan dokaz da β-karoten koristi $^1O_2$ za sprječavanje starenja kože pod utjecajem svijetla kroz kemijsku reakciju s $^1O_2$. [17]

3.5. BOJA TVARI I VIDLJIVI SPEKTAR

Da bi ljudsko oko vidjelo boju nekog predmeta, taj predmet mora apsorbirati svjetlost u vidljivom području (400-800 nm) elektromagnetskog zračenja. Crni predmet apsorbira sve valne duljine vidljivog spektra, a bijeli predmet reflektira sve valne duljine. Ako su apsorbirane samo neke valne duljine, a ostale reflektirane ili propuštene, zamjećuje se boja. Vidimo boju komplementarnu onoj koja je apsorbirana. Ako tvar propušta fotone svih valnih duljina vidljivog djela spektra ona je bezbojna. Tvar je crvene boje ako apsorbira valne duljine od 400 do 600 nm jer propušta crveni dio spektra od 600 do 700 nm. Tvar je ljubičasta ako propušta valne duljine oko 400 nm, ali i ako propušta fotone iz ljubičastog, plavog i crvenog spektralnog područja. Znači da se samo na temelju boje ne može zaključiti koji dio spektra tvar apsorbira. Zato je potrebno snimiti apsorpcijski spektar, a metoda se zove apsorpcijska spektrometrija. [3]

Konjugirani spojevi imaju jedinstveno svojstvo koje dovodi do stvaranja boje. Mnogi pigmenti koriste konjugirani sustav dvostrukih veza, kao npr. dugi konjugirani ugljikovodični lanac u β-karotenu što rezultira stvaranjem karakteristične narančaste boje. Konjugirani sustav koji sadrži manje od osam dvostrukih konjugiranih veza apsorbira u ultraljubičastom području i bezbojni su ljudskom oku. Sa svakom dodanom dvostrukom vezom sustav apsorbira foton veće valne duljine i veće energije, a boja spoja varira od žute do crvene boje. Plavi i zeleni spojevi se obično ne oslanjaju samo na konjugiranost dvostrukih veza. Konjugirani organski spojevi s više nezasićenih veza su obojeni jer se njihovi apsorpcijski maksimumi nalaze se u vidljivom području. β-karoten ima λ_{max}= 450 nm i obojen je narančasto. Mnogi organski spojevi su obojeni jer je njihova UV-apsorpcija proširena u vidljivo područje.

Zašto je β-karoten narančast? β-karoten ima jedanaest konjugiranih dvostrukih veza. Što je veća mogućnost delokalizacije to je manji razmak između π vezne orbitale veće energije i π protuvezne orbitale manje energije. Za pomak eletrona u β-karotenu potrebno je manje energije jer je razlika između energijskih nivoa mala. Manje energije potrebno za pomak znači manja frekvencija apsorbiranog svjetla što odgovara većoj valnoj duljini. β-karoten apsorbira kroz ultraljubičasto područje u ljubičastom, ali osobito snažno apsorbira u vidljivom djelu spektra između 400-500 nm s maksimumom oko 470 nm. Karoten apsorbira plavu boju, a narančaste je boje jer propušta svjetlost valne duljine 590-625 nm. [7]

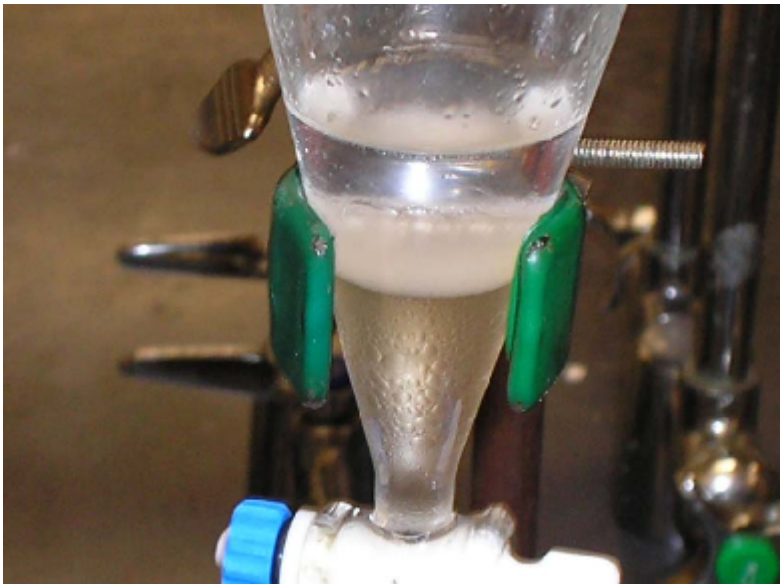
3.6. METODE PRIMJENJENE U POSTUPKU IZOLACIJE I DOKAZIVANJE PIGMENATA

3.6.1. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija se koristi kao metoda za izolaciju spojeva. Zasniva se na zakonu razdjeljenja. Definira se kao izdvajanje neke tvari iz krute smjese, suspenzije ili otopine pomoću otapala. Pri izdvajanju tvari jedna od komponenti je obično voda, a druga organsko otapalo koje se s vodom ne miješa. Tvar koja se ekstrahira mora biti topljivija u otapalu nego u polaznoj fazi. Postoje dvije vrste ekstrakcije: ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija kruto-tekuće. Postupak ekstrakcije se izvodi u lijevku za odjeljivanje. Kod ekstrakcije dolazi do raspodjele tvari između dvije faze koje se ne mješaju. Nakon razdvajanja otapala na dva sloja omjer koncentracija u otapalima je stalan bez obzira na volumene otapala i količinu otopljenje tvari. Tu je pojavu izrazio Nernst poznatu kao Nernst-ov zakon razdjeljenja:

$$K = c_1/c_2$$

gdje c_1 i c_2 mogu biti množinske i masene koncentracije, a konstanta K je koeficijent razdjeljenja. Iz koeficijenta razdjeljenje se može točno predvidjeti ponašanje tvari koje se raspodjeljuje između otapala. Ako je $K > 1$ tvar je topljivija u gornjem otapalu pa je nakon izmućkivanja koncentracija tvari u gornjem otapalu K puta veća nego u donjem. Ako je $K<1$ koncentracija će tvari će biti $1/K$ puta veća u donjem otapalu. Prema zlatnom pravilu ekstrakcije svaka se ekstrakcija ponavlja tri puta da bi se tvar potpuno prevela iz jednog otapala u drugo. Sam prijelaz tvari vrši se na dodirnoj površini između otapala. Zbog što uspješnije ekstrakcije tu je dodirnu površinu potrebno povećati izmućkivanjem. [4]



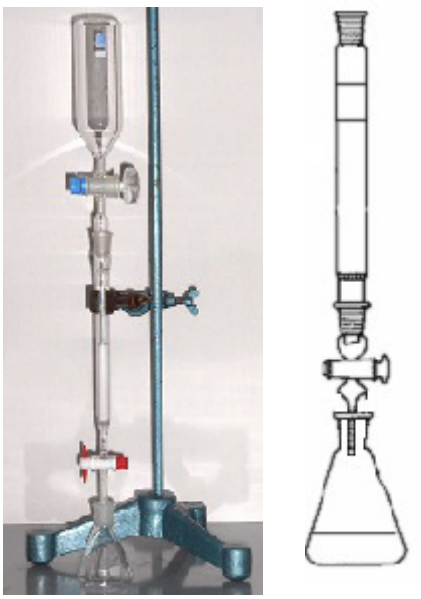
Slika 20. Ekstrakcija u lijevku za odjeljivanje

3.6.2. KROMATOGRAFIJA NA STUPCU

Kromatografija na stupcu se izvodi u koloni koja je napunjena krutim adsorbensom, a otapalo protječe kolonom pod utjecajem gravitacije. Kao kruta, stacionarna faza najčeće se koristi silikagel ili aluminijev oksid, dok se kao mobilna faza koristi neko organsko otapalo ili smjesa otapala. Tvar nanesena na kolonu adsorbira se na stacionarnu fazu, a otapalo otapa tvar i ispire je s kolone. Dok tvar putuje kolonom, dolazi do kontinuiranog niza adsorpcija i otapanja. Jedan dio se otopi u otapalu, a jedan dio se adsorbira na koloni i tako se uspostavlja ravnoteža između eluensa i adsorbensa. Različite tvari imaju različite koeficijente razdiobe, pa putuju različitom brzinom kolonom i na tome se temelji razdvajanje komponenti. Tako se na koloni stvore zone čistog spoja, koje se zatim jedna za drugom eluiraju. Eluat se hvata u frakcijama koje se zatim spajaju. Kojom će brzinom tvari putovati kroz kolonu ovisi o jakosti vezanja tvari za stacionarnu fazu i o njenoj topljivosti u eluensu. Kruti adsorbens je obično polaran pa se polarne tvari jače adsorbiraju od manje polarnih. Zato uz upotrebu nepolarnog otapala nepolarne tvari putuju brže, dok polarne ostaju vezane za stacionarnu fazu. Osim o polarnosti na redoslijed eliuranja utječe i molekularna masa. Tvari manje molekularne mase putovat će brže od onih veće molekularne mase. Prije razdvajanja smjese na koloni potrebno je pronaći odgovarajuće otapalo koje optimalno razdvaja komponente. Za to se upotrebljava tankoslojna kromatografija (TLC). Pogodno otapalo je ono u kojeg je razlika R_f-vrijednosti pojedinih komponenata 0,1; a da se područje R_f vrijednosti najmanje polarne i najpolarnije tvari

kreće od 0,2 do 0,8. Ukoliko nema takvog otapala, koristi se ili smjesa otapala, ili se mijenja otapalo tijekom razdvajanja. S kolone se redovito uklanjaju najprije nepolarne tvari, što znači da eluiranje obično započinje s nepolarnim otapalom, a zatim se postupnim povećavanjem polarnosti eluiraju polarne tvari. [4]

Za dobro odjeljivanje neobično je važno punjenje staklene cijevi adsorbensom, odnosno priprema kromatografske kolone. Adsorbens mora biti jednolično raspoređen u cijevi jer u protivnom brzina protjecanja otapala nije jednolična, te zbog toga nastaju razvučene i nepravilne zone. Bilo da se kolona puni suspenzijom adsorbensa u otapalu ili se adsorbens nesuspendiran dodaje u kolonu s otapalom, važno je da za vrijeme punjenja otapalo stalno protječe kroz kolonu, jer se time smanjuje mogućnost nastajanja mjehurića zraka u stupcu adsorbensa. Oštrina zone u koloni ovisi o koncentraciji otopine uzorka i načinu dodavanja te otopine. Ne smije se uzdrmati površina adsorbensa jer može nastati nepravilna zona koja pri eluiranju daje razvučene i slabo odijeljene zone pojedinih komponenti. Stoga se na gornju površinu adsorbensa obično stavi komadić filter-papira ili tanak sloj čistog pijeska. [5]



Slika 21. Aparatura za kromatografiju na koloni

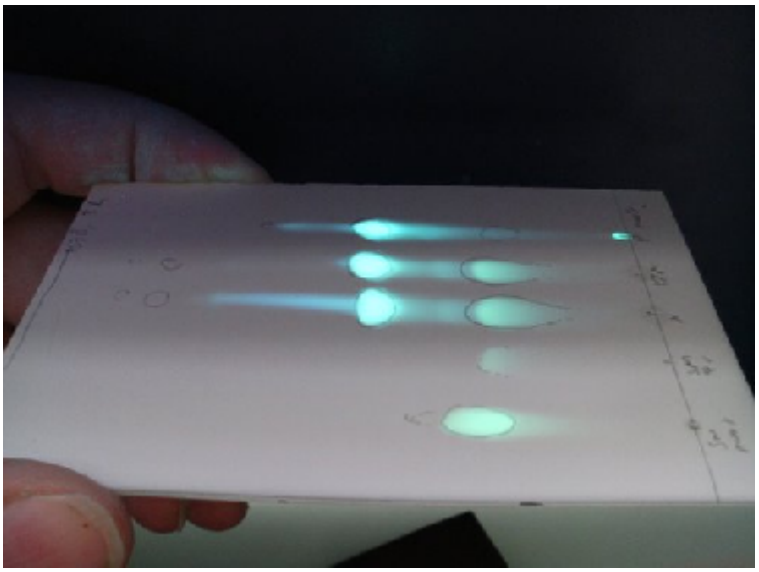
3.6.3. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

Tankoslojna se kromatografija isto kao i kromatografija na stupcu zasniva na razdiobi tvari između krutog adsorbensa i teluće mobilne faze. Izvodi se na staklenoj, metalnoj ili plastičnoj pločici presvučenoj tankim slojem krutog adsorbensa. Vrlo mala količina otopljenog uzorka se nanese kapilarom na adsorbens. Pločica se unese u eluens tako da naneseni uzorak ostane iznad razine otapala, pošto otapalo ishlapi. Eluens se uspinje po adsorbensu zbog kapilarnih sila i različitim brzinama nosi tvari iz nanesene smjese. Mjesto na koje se nanosi uzorak zove se start, a fronta je zona najveće udaljenosti mobilne faze od starta. Kada se fronta otapala približi gornjem rubu pločice, ona se izvadi iz otapala i detektiraju se zone koje određuju mjesto pojedine komponente. Brzina prolaska tvari po pločici proporcionalna je prevaljenom putu. Na brzinu ukazuje R_f faktor koji je definiran kao omjer prijeđenog puta tvari od starta (x) i udaljenosti fronte od starta (y):

$$R_f = x/y$$

Ako komponente nisu obojene, valja ih učiniti vidljivima kako bi se mogla izmjeriti R_f vrijednost. Za detekciju komponenti najčešće se koristi ultraljubičasto svjetlo (UV), reverzibilna adicija joda i prskanje sumpornom kiselinom. Pločica s definiranim mjestima adsorbirane tvari zove se kromatogram. Upotreba tankoslojne kromatografije je raznovrsna. Upotrebljava se za utvrđivanje identičnosti tvari na osnovi R_f vrijednosti. Može se saznati i broj komponenata neke smjese. Koristi se za praćenje reakcije, u preparativne svrhe, te za pronalazak pogodnog otapala koje će dobro odvajati komponente. [4]

Slika 22. Kromatogram



Slika 23. Detekcija komponenti pomoću UV svjetla

3.7. MATERIJALI I METODE

3.7.1. MATERIJALI

Supstrat i kemikalije: koncentrat rajčice, strugana mrkva, mljevena crvena paprika, sitno nasjeckana svježa paprika, metanol, kloroform, Na_2SO_4 (bezvodni), petroleter, aceton, aluminijev oksid, voda.

Posuđa: tikvica s okruglim dnom od 100 mL, nastavak za redukciju, Liebigovo hladilo, Büchnerov lijevak, odsisna boca od 250 mL, lijevak za odjeljivanje od 250 mL, vodena kupelj, Erlenmeyerove tikvice od 100 mL, Erlenmeyerove tikvice s čepom, kromatografska kolona, filter-papir, štapić, menzura od 100 mL, menzura od 10 mL, kromatografska kada, pločica sa tankim slojem silikagela.

3.7.2. METODE

3.7.2.1. Ekstrakcija pigmenata iz rajčice

10 g koncentrata rajčice, 25 ml metanola i 50 ml kloroforma refluksira se pod povratnim hladilom u tikvici s okruglim dnom preko vodene kupelji temperature 50 – 55 °C 5 minuta uz povremeno mućkanje. Smjesa se ohladi i filtrira preko Büchnerovog lijevka, te ponovi ekstrakcija taloga s 50 ml kloroforma, kako je to već opisano. Ohlađena se smjesa ponovno filtrira i talog odbaci, oba se filtrata spoje i tri puta isperu u lijevku za odjeljivanje sa po 50 ml vode. Donji organski slojevi se ispuste u Erlenmeyerovu tikvicu, a gornji vodeni odbace. Skupljeni se organski ekstrakti suše u začepljenoj Erlenmeyerovoj tikvici sa 1 – 2 g natrijevog sulfata. Nakon 5 – 10 minuta otopina se preko nabrana filter papira profiltrira u tikvicu s okruglim dnom i upari.

3.7.2.2. Ekstrakcija pigmenata iz mrkve

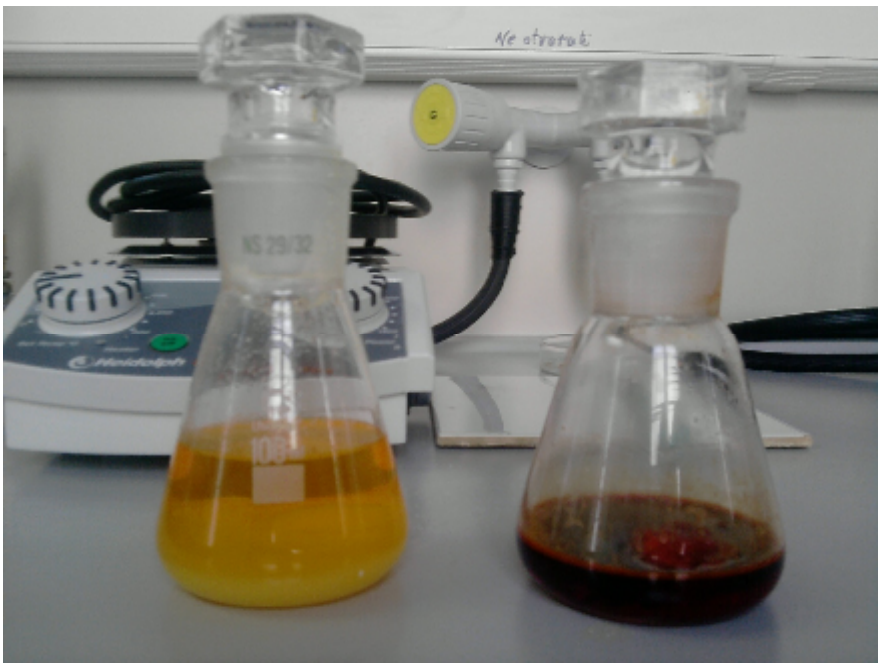
10 g koncentrata strugane mrkve, 25 ml metanola i 50 ml kloroforma refluksira se pod povratnim hladilom u tikvici s okruglim dnom preko vodene kupelji temperature 50 – 55 °C 5 minuta uz povremeno mućkanje. Smjesa se ohladi i filtrira preko Büchnerovog lijevka, te ponovi ekstrakcija taloga s 50 ml kloroforma, kako je to već opisano. Ohlađena se smjesa ponovno filtrira i talog odbaci, oba se filtrata spoje i tri puta isperu u lijevku za odjeljivanje sa po 50 ml vode. Donji organski slojevi se ispuste u Erlenmeyerovu tikvicu, a gornji vodeni odbace. Skupljeni se organski ekstrakti suše u začepljenoj Erlenmeyerovoj tikvici sa 1 – 2 g natrijevog sulfata. Nakon 5 – 10 minuta otopina se preko nabrana filter papira profiltrira u tikvicu s okruglim dnom i upari.

3.7.2.3. Ekstrakcija pigmenata iz svježe crvene paprike

10 g koncentrata sitno nasjeckane svježe paprike, 25 ml metanola i 50 ml kloroforma refluksira se pod povratnim hladilom u tikvici s okruglim dnom preko vodene kupelji temperature 50 – 55 °C 5 minuta uz povremeno mućkanje. Smjesa se ohladi i filtrira preko Büchnerovog lijevka, te ponovi ekstrakcija taloga s 50 ml kloroforma, kako je to već opisano. Ohlađena se smjesa ponovno filtrira i talog odbaci, oba se filtrata spoje i tri puta isperu u lijevku za odjeljivanje sa po 50 ml vode. Donji organski slojevi se ispuste u Erlenmeyerovu tikvicu, a gornji vodeni odbace. Skupljeni se organski ekstrakti suše u začepljenoj Erlenmeyerovoj tikvici sa 1 – 2 g natrijevog sulfata. Nakon 5 – 10 minuta otopina se preko nabrana filter papira profiltrira u tikvicu s okruglim dnom i upari.

3.7.2.4. Ekstrakcija pigmenata iz mljevene paprike

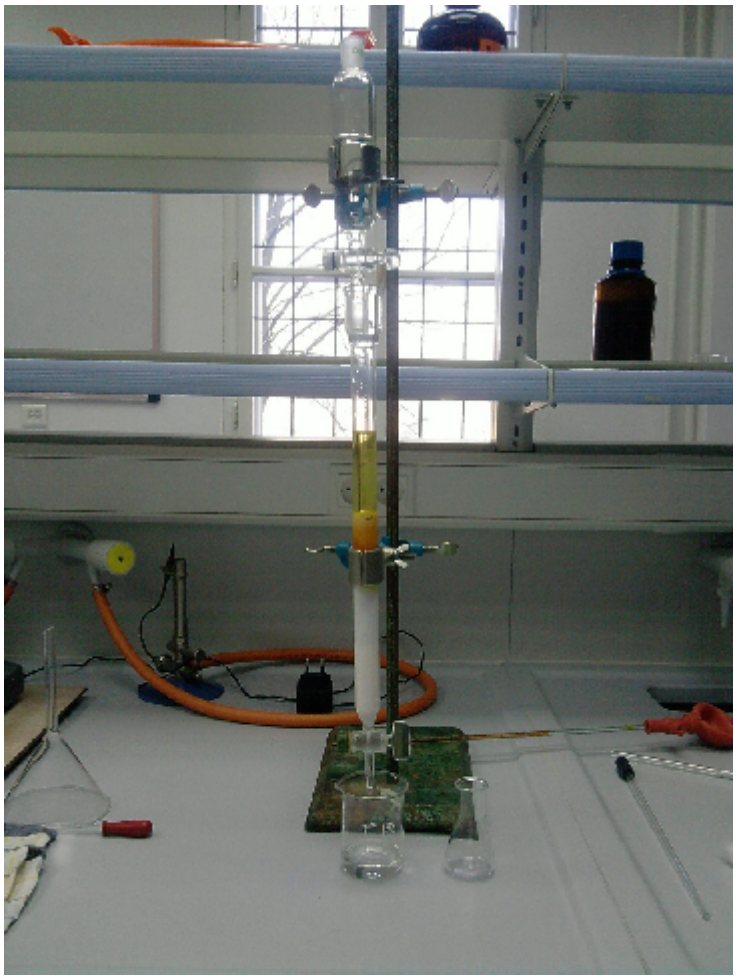
Budući da mljevena paprika sadrži veću koncentraciju pigmenata ekstrakcija ne obuhvaća proces refluksiranja već je dovoljno pigmente jednostavno otopiti u kloroformu. U tu svrhu se u Erlenmeyerovu tikvicu stavi 2 – 3 žličice mljevene paprike i ulije 50 mL kloroforma. Sadržaj tikvice se intenzivno miješa 1 – 2 minute, a zatim se smjesa profiltrira. Filtrat je tamnocrvene boje. Ispere ga se destiliranom vodom tri puta u obrocima od 50 ml. Preostala voda se ukloni pomoću 1–2 g bezvodnog natrijevog sulfata. Ekstrakt se filtrira i upari na približno 1 mL.



Slika 24. Ekstrakti iz mrkve i mljevene paprike

3.7.2.5. Odjeljivanje pigmenata kolonskom kromatografijom

1/3 volumena kromatografske kolone ispuni se petroleterom, na dno se stavi svitak vate, ispuni s otprilike 10 g aluminijeva oksida, te na vrh nanese (uz pomoć kapalice) 1,5 – 2 ml esktrakta pigmenta. Kad se sloj ekstrakta gotovo upije, stjenka se ispere s malo petroletera. Time se ekstrakt ujedno i upije na adsorbens. Zatim se eluira smjesom aceton: petroleter u volumnom omjeru 10 : 90. Eluat se hvata u Erlenmeyerovu tikvicu. Kad se pojavi prva obojena kap tikvica se promjeni i eluira karotenoidna frakcija do gubitka obojenja. Napravljena je kolonska kromatografija za sva četiri uzorka.



Slika 25. Kolonska kromatografija

3.7.2.6. Identifikacija pigmenata tankoslojnom kromatografijom

Na pločicu s tankim slojem silikagela kapilarom nanese se mrlja dobivenog ekstrakta nakon kolonske kromatografije i mrlja smjese prije kolonske kromatografije na startnu liniju. Startna linija je 1,5 – 2 cm udaljena od ruba pločice. Pločica se stavi u kadu u kojoj se nalazi kloroform; pritom treba paziti da mrlja nije uronjena u otapalo. Pomoću kapilarnih sila eluens se diže uz pločicu i eluira sastojke smjese. Olovkom se označi dokle se popelo otapalo i zatim se pločica osuši.

Slika 26. Razvijanje kromatograma

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tankoslojna se kromatografija isto kao i kromatografija na stupcu zasniva na razdiobi tvari između krutog adsorbensa i tekuće mobilne faze.[4]

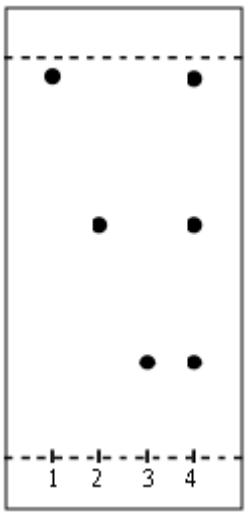
Tankoslojna kromatografija (TLC) je zahvaljujući svojoj jednostavnosti postala jednom od najraširenijih metoda. Karakterizira je detekcija odvojenih tvari nakon kromatografskog završetka, za razliku od kromatografije na stupcu kod koje se detekcija uglavnom vrši istovremeno s kromatografskim procesom. TLC karakterizira manji omjer mobilne faze prema stacionarnoj fazi. Najviše se koristi u analitici, a nešto manje za izolaciju pojedinih sastojaka iz smjese. U mnogim se slučajevima ne primjenjuje sama već je povezana s drugim postupcima. U ovom radu koristila se i ekstrakcija i kromatografija na stupcu. Sam izbor tanskoslojne kromatografije ovisi o mnogo čimbenika, ponajviše o problemu koji treba riješiti. Prednost je prije svega u jednostavnosti izvedbe, a drugo potrebna je mala količina uzoraka. Nepoželjne stvari su razne poteškoće u pripravi uzoraka. Analiza je ograničena na spojeve koji su dobro topljivi u nekom otapalu, koji ne ishlapljuju i koji su dobro postojani za vrijeme procesa. TLC može biti od velike koristi s ostalim metodama za identifikaciju spojeva. Primjenjuje se u prehrambenoj industriji, pa smo je tako i upotrijebili, zajedno sa kromatografijom na stupcu, za identifikaciju spojeva u mrkvi, rajčici, svježoj i mljevenoj paprici. [12]

Kromatografija na stupcu je adsorpcijska kromatografija, isto kao i TLC temelji se na razdvajanju smjese. Dok se kod TLC smjesa uspinje pomoću kapilarnih sila prema fronti otapala i tako dolazi do razdvajanja smjese, u kromatografiji na stupcu uzorak se propušta kroz kolonu uz pomoć gravitacijskih sila. Dok tvar putuje kolonom, dolazi do kontinuiranog niza adsorpcija i otapanja. Jedan dio se adsorbira na kolonu, polarna komponenta jer je sam adsorbens aluminijev oksid polaran, a drugi dio se otopi u otapalu, nepolarna komponenta. Zato je za razdvajanje korištena smjesa otapala aceton:petroleter u volumnom omjeru 10:90. Najprije su razdvojeni, eluirali karoteni, kao nepolarne komponente, a onda ksantofili, kao polarne.

Postoji još jedna vrsta kromatografije koja se koristi za identifikaciju tvari iz smjese, ali i za njihovo kvantitativno određivanje. To je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC. Važna je primjena HPLC u ispitivanjima hrane, tla, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na prisustvo i sadržaj štetnih supstancija, npr., pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika kao potencijalnih karcinogena i mutagena. Nadalje HPLC primjenjuje se za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina, itd.

Na temelju TLC i kromatografije na stupcu uvidjeli smo da se mrkva, rajčica, svježa i mljevena paprika sastoje od smjese karotenoida. Mrkva ima relativno jednostavan sastav. *Trans* β-karoten je najviše zastupljen. Uspješno su identificirani i drugi karotenoidi. Na kromatogramu je vidljivo da su kolonskom kromatografijom odijeljeni β-karoten (R_f = 0.95), α-karoten (R_f = 0.58) i γ-karoten (R_f = 0.24).

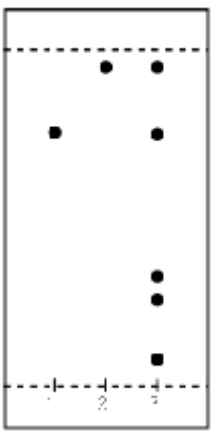
1. β-karoten
2. α-karoten
3. γ-karoten
4. Smjesa karotena



Slika 27. kromatogram mrkve

U rajčici su identificirani likopen i β-karoten kao glavni karotenoidi što se podudara sa podatkom pronađenim u literaturi *(J. Burns i suradnici, 2003)* [16]. Kod rajčice nisu svi karotenoidi uspješno izolirani. Uspješno su izolirali samo likopen (R_f = 0.75) i β-karoten (R_f = 0.95), dok u svom sastavu rajčica sadrži i druge karotene i ksantofile karakteristične po svojoj boji, koji nisu uspješno izolirani.

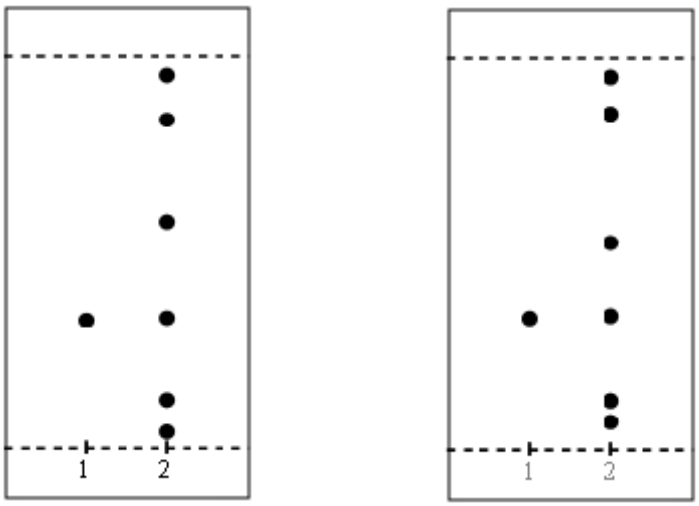
1. likopen
2. β-karoten
3. smjesa karotenoida



Slika 28. kromatogram rajčice

Svježa i mljevena paprika imaju isti kemijski sastav. Sastav paprike okarakteriziran je prisustvom dvaju karotenoida kapsantina i kapsarubina [16]. U svom radu *(A. Zeb i suradnici, 2010),* uspješno su izolirali karotenoide u svježoj i mljevenoj paprici. Kod ekstrakcije su koristili smjesu etanola i heksana. Za identifikaciju pomoću TLC-a su upotrijebili smjesu otapala aceton : petroleter u volumnom omjeru 1 : 1. Karotenoidi koje su izolirali i identificirali su sljedeći: β-karoten (R_f = 0.95), kriptoksantin (R_f = 0.61), zeaksantin (R_f = 0.55), anteraksantin (R_f = 0.43), violaksantin (R_f = 0.37), kapsantin (R_f = 0.30), kapsarubin (R_f = 0.19), neoksantin (R_f = 0.13). [9] U ovom radu ekstrahirana je smjesa karotenoida. Iz te smjese pomoću kolonske kromatografije uspješno je izoliran jedan karotenoid pomoću smjese otapala aceton : petroleter u volumnom omjeru 10 : 90. Pomoću tankoslojne kromatografije kod koje smo kao eluens koristili kloroform identificirali smo taj karotenoid i usporedbom sa literaturnim podacima zaključili da bi taj karotenoid mogao biti kapsantin (R_f = 0.33) zbog vrlo bliskih R_f vrijednosti.

1. kapsantin
2. smjesa karotenoida



Slika 29. kromatogrami svježe i mljevene paprike

Tablica 1. Rezultati R_f vrijednosti za izolirane karotenoide

Uzorak	Pigment	R_f vrijednost
Mrkva	β-karoten	0.95
Rajčica	β-karoten	0.95
	Likopen	0.75
svježa paprika	Kapsantin	0.33
mljevena paprika	Kapsantin	0.33

5. ZAKLJUČAK

Opisane i predložene metode za izolaciju pigmenata iz svježe crvene paprike, mljevene paprike, rajčice i mrkve pokazale su se učinkovitima. U adsorpcijskoj kromatografiji kao mobilna faza se upotrebljavaju otapala koja se razlikuju sposobnošću desorbiranja (eluiranja) pojedinih tvari sa stacionarne faze. Što je tvar jače adsorbirana na stacionarnu fazu koristimo se otapalom s većom moći eluiranja. Tako smo u ovom radu koristili kloroform kao mobilnu fazu. Ovaj rad pokazuje da boju uzoraka ne čini jedan spoj već da se radi o smjesi spojeva, pigmenata iz skupine karotenoida. Dokazivanje tih pigmenata je uspješno izvedeno uporabom tankoslojne kromatografije (TLC), a na pločicama se razlikuje nekoliko skupina pigmenata. Također je dokazano da nisu svi pigmenti samo crvene boje, već da postoje i pigmenti žute boje iz skupine ksantofila, prije svega luteina i zeaksantina kod rajčice. Podatci iz tablice pokazuju da se u svježoj paprici nalaze isti pigmenti kao i u mljevenoj paprici. Takvi su se rezultati i očekivali kod svježe i mljevene paprike jer se kod priređivanja mljevene paprike kemijski sastav ne mijenja. Kromatogram mrkve pokazuje da su karotenoidi uspješno izolirani. Isto tako uspješno je izoliran likopen kojeg u rajčici ima najviše. Iz rajčice je izoliran i β-karoten.

6. LITERATURA

[1] D. B. Rodrigez-Amaya: A guide to carotenoid analysis in food, ILSI Press, Washington, 2001.

[2] lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/carotenoids, (2009)

[3] S. H. Pine: Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1994.

[4] O. Kronja, S. Borčić: Praktikum preparativne organske kemije, Školska knjiga, Zagreb 2004.

[5] V. Rapić: Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb 2008.

[6] H. Tesso, Isolation and structure elucidation of natural product from plants, dissertation, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry Hamburg, 2005.

[7] www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/teory.html, (2007).

[8] W. Stahl, H. Sies, Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine,* **24** (2003), 345–351.

[9] A. Zeb, M. Murkovic, Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples, *Journal of planar chromatography*, **23** (2010), 94-103.

[10] C. R. Noller: Kemija organskih spojeva, Tehnička knjiga, Zagreb, 1967.

[11]www.nutricionizam.com/index.php?option=com_content&view=article&id=413:retinol-vitamin-a&catid=33:vitamini&ltemid=33, (2008).

[12] S. Turina: Tankoslojna kromatografija, SKTH i Kemija u industriji, Zagreb, 1984.

[13] C. H. Lin, B. H. Chen, Stability of carotenoids in tomato juice during storage, *Food Chemistry,* **90** (2005), 837–846.

[14] D. E. Rubio-Diaz, T. De Nardo, A. Santos, S. de Jesus, D. Francis, L. E. Rodriguez-Saona, Profiling of nutritionally important carotenoids from genetically-diverse tomatoes by infrared spectroscopy, *Food Chemistry,* **120** (2010), 282–289.

[15] O. Collera-Zuniga, F. Garcıa Jimenez, R. Melendez Gordillo, Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of Capsicum annuum L, *Food Chemistry,* **90** (2005), 109–114.

[16] J. Burns, P. D. Fraser, P. M. Bramley, Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables, *Phytochemistry,* **62** (2003), 939–947.

[17] J. Terao, Y. Minami, N. Bando, Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging, *Journal of clinical biochemistry and nutrition,* **48** (2011), 57–62.

[18] http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000900036&script=sci_arttext, (2009).