



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CCT

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS, IN-NATURA,
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.**

Oswaldo Trigueiro Neto

Campina Grande - PB

- 2018 -

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CCT

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS, IN-NATURA,
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.**

Oswaldo Trigueiro Neto

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Dr. Kennedy Leite Agra apresentada à Unidade Acadêmica de Física da Universidade Federal de Campina Grande, em complementação aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Física.

Campina Grande - PB

- 2018 -

T828i Trigueiro Neto, Osvaldo.
Identificação de carotenoides em vegetais, in-natura, utilizando espectroscopia fotoacústica / Osvaldo Trigueiro Neto. – Campina Grande, 2018.
71 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.
"Orientação: Prof. Dr. Kennedy Leite Agra, Prof. Dr. José Suassuna Filho".
Referências.

1. Física Atômica. 2. Física Molecular. 3. Espectroscopia Fotoacústica e UV-Visível Convencional. 4. Carotenoides. I. Agra, Kennedy Leite. II. Suassuna Filho, José.

CDU 539.18(043)

Folha de Aprovação

Prof. Dr. Kennedy Leite Agra

Orientador

Prof. Dr. José Suassuna Filho

Examinador Interno

Prof. Dr. Renilton Correia da Costa

Examinador Externo

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família
e minha namorada por todo apoio
nos momentos difíceis.

Agradecimentos

Inicialmente eu gostaria de agradecer aos meus pais por sempre me apoiarem e permitirem que eu me dedicasse aos estudos.

Quero também agradecer aos meus tios por terem me abrigado durante toda esta jornada me provendo tudo necessário para concluí-la.

À Yasmim Stephanie por nunca me deixar desanimar nas horas difíceis e por sempre me dar forças para seguir nesta jornada.

Gostaria também de agradecer aos Professores Dr. Kennedy Leite Agra, por me orientar e ajudar durante toda realização do trabalho e Dr. José Suassuna Filho, pelas sugestões e explicações sobre o tema.

Agradeço a todos os colegas, por me ajudarem tirando dúvidas e pelos bate-papos para descontraír também aos professores da Unidade Acadêmica de Física, por todo o conhecimento transmitido.

Por fim, gostaria de agradecer a CAPES por ter ajudado com o financiamento do meu mestrado.

Lista de Ilustrações e Figuras

Figura 1 – Forma geral dos carotenoides.....	16
Figura 2 – Ilustração de uma molécula de Licopeno onde ocorre isomeria Trans (a) e Cis (b). 16	16
Figura 3 – Alguns dos carotenoides encontrados no nosso corpo. a) <i>Licopeno</i> ; b) β - <i>Caroteno</i> ; c) <i>Zeaxantina</i> ; d) <i>Luteína</i>	17
Figura 4 – Estrutura da β -Ionona.....	18
Figura 5 – Formação dos orbitais $1s_g$ e $1s_u^*$ a partir de dois orbitais atômicos $1s$, com mais alta e mais baixa energia do que os orbitais que os geram.	20
Figura 6 – Formação dos orbitais $2p_{\sigma g}$ e $2p_{\sigma u}^*$ a partir da combinação de dois orbitais $2p_z$	21
Figura 7 – Níveis de energia molecular eletrônica e principais transições orbitais.....	22
Figura 8 – Visualização das regiões do espectro onde ocorrem transições.....	23
Figura 9 – Espectro UV-Visível de polienos na forma $CH_3(CH=CH)_nCH_3$ com $n = 3,4$ e 5 . 24	24
Figura 10 – Diagrama ilustrando o efeito da conjugação nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em hidrocarbonetos insaturados.....	25
Figura 11 – Estrutura de ligações da acetona e do Isopropilideno, mostrando o aumento na conjugação (aumento de duplas ligações).	25
Figura 12 – Efeito da conjugação nas transições $n \rightarrow \pi^*$	26
Figura 13 – Efeito de solvente apolar e polar em transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$	26
Figura 14 – Estrutura molecular da <i>flavoxantina</i>	27
Figura 15 – Absorção de radiação pela solução.....	28
Figura 16 – Espectro de absorção.....	30
Figura 17 – Formas de decaimento radioativo e não-radioativo.....	33
Figura 18 – Efeitos da radiação modulada na amostra.	34
Figura 19 – Ilustração do efeito de difusão térmica.	35
Figura 20 – Ilustração da Expansão térmica.	35
Figura 21 – Ilustração da Flexão Termoelástica.	36
Figura 22 – Ilustração da contribuição fotobárica.....	36
Figura 23 – Ilustração de três diferentes amostras quanto à absorção de luz incidente.	37
Figura 24 – Ilustração da geração de ondas de pressão, dentro da câmara fechada, onde o microfone as detecta.	38
Figura 25 – Explicação da câmara fotoacústica utilizada no modelo RG.	40
Figura 26 – Ilustração do Pimentão com corte vertical.....	41
Figura 27 – Liquidificador utilizado no preparo das amostras destinadas a medições de UV-Visível. Philips Walita 1000 W.....	43
Figura 28 – Liofilizador, modelo Liotop L108 pertencente ao CERTBIO – UFCG, utilizado no trabalho.	43
Figura 29 – Amostras de pimentão já liofilizadas.....	43
Figura 30 – Espectrômetro Cary 50 Bio utilizado para as medidas.....	44
Figura 31 – Esquematização do espectrômetro UV-Vis mostrando o trajeto percorrido pelo feixe até o fotodetector.....	45
Figura 32 – Diagrama do Espectrômetro Fotoacústico.	47

Figura 33 – Detalhes da Célula Fotoacústica e do Sinal Fotoacústico detectado.	48
Figura 34 – Relação sinal/ruído no pré-amplificador.	49
Figura 35 – Espectros PAS acumulados do negro fumo.	50
Figura 36 – Espectro UV-Visível do pimentão verde.	52
Figura 37 – Espectro UV-Visível do pimentão amarelo.	53
Figura 38 – Espectro UV-Visível do pimentão vermelho.	53
Figura 39 – Espectro Fotoacústico para os pimentões com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	55
Figura 40 – Espectro Fotoacústico do pimentão creme com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	57
Figura 41 – Espectro Fotoacústico do pimentão verde com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	59
Figura 42 – Espectro Fotoacústico do pimentão amarelo com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	61
Figura 43 – Espectro Fotoacústico do pimentão laranja com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	63
Figura 44 – Espectro Fotoacústico do pimentão vermelho com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.	65
Figura 45 – Espectro Fotoacústico para o pimentão roxo com a região espectral visível que abrange as moléculas de carotenoides.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Alguns carotenoides e suas aplicações médicas.....	15
Tabela 2 - As transições e suas respectivas quantizações.....	31
Tabela 3 - Parâmetros fototérmicos utilizados.....	39
Tabela 4 - Carotenoides previstos nos pimentões a serem estudados neste trabalho[2, 28-31].	42
Tabela 5 - Massas pesadas de amostra liofilizada.....	45
Tabela 6 - Tabela contendo informações dos espectros de UV-Visível dos três pimentões. Contendo o numero do Pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	54
Tabela 7 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão creme, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	57
Tabela 8 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão verde, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	59
Tabela 9 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão amarelo, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	61
Tabela 10 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão laranja, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	63
Tabela 11 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão vermelho, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	65
Tabela 12 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão roxo, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.....	67

Resumo

Neste trabalho, amostras nas variações verde, vermelho, laranja, roxo, creme e amarelo do pimentão (*Capsicum L. annum*) foram analisadas. Estas análises foram realizadas através de dois espectrômetros, sendo um fotoacústico e o outro um UV-Visível Convencional, ambos pertencentes ao Laboratório de Fotoacústica da Unidade Acadêmica de Física da Universidade Federal de Campina Grande. O principal objetivo destas análises foi determinar a presença de biomoléculas, mais especificamente o grupo dos carotenoides, além de também comprovar a efetividade da técnica de Fotoacústica como um método diferenciado de investigação, já que a maior parte das outras técnicas de espectroscopia precisa de preparo nas amostras, como por exemplo, a solubilização que causa efeitos indesejados nas amostras, desde deslocamento de picos até alterações em compostos presentes, como reportado na literatura[1, 2], enquanto na PAS as amostras podem ser medidas *in-natura*. Os espectros PAS foram comparados com os de UV-Visível, tanto os medidos no trabalho como os encontrados na literatura.

Palavras-chaves: Espectroscopia, UV-Visível, PAS, Fotoacústica, Carotenoides.

Abstract

In the present work, green, red, orange, purple, white and yellow varieties of bell pepper (*Capsicum L. annuum*) samples were analyzed. These analyzes were done through two different spectrometers, one being a Photoacoustic Spectrometer and the second one being an Conventional UV-Visible Spectrometer, both belonging to the Photoacoustic Spectroscopy Laboratory at the Physics Academic Unit of the Federal University of Campina Grande. the main objective of these analyses were to determine the presence of biomolecules in the bell peppers, namely the carotenoid group, thus proving the effectiveness of the Photoacoustic technique as a differentiate method for investigation, given that most spectroscopy techniques need previous preparation, e.g. solubilization, which is known to cause unwanted effects on the samples as shift on the measured spectrum's peaks besides possible changing the present compounds, as previously reported[1, 2], while in PAS the measurements might be made *in-natura*. The measured PAS spectra were compared with the UV-Visible measured spectra and with the spectra found at the literature.

Keywords: Spectroscopy, UV-Visible, PAS, Photoacoustic, Carotenoids.

Sumário

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 2 – REVISÃO TEÓRICA	14
2.1 CAROTENOIDES.....	14
2.1.2 PROPRIEDADES QUÍMICAS.....	15
2.1.2 MORFOLOGIA DOS CAROTENOIDES	17
2.1.3 FUNCIONALIDADES E PROPRIEDADES	17
2.2 TEORIAS DOS ORBITAIS MOLECULARES.....	18
2.2.1 ESTRUTURA ELETRÔNICA DE MOLÉCULAS DIATÔMICAS.....	18
2.2.2 ESTRUTURA ELETRÔNICA DE MOLÉCULAS POLIATÔMICAS.....	21
2.2.3 TIPOS DE TRANSIÇÕES.....	22
2.2.4 EFEITO DA CONJUGAÇÃO	24
2.2.5 EFEITO DO SOLVENTE	26
2.3 TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIAS	27
2.3.1 A LEI DE LAMBERT-BEER.....	27
2.3.2 A TEORIA FOTOACÚSTICA.....	30
2.3.2.1 INTRODUÇÃO	30
2.3.2.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO E MECANISMOS GERADORES DE CALOR.....	31
2.3.2.3 O EFEITO FOTOACÚSTICO	38
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 PIMENTÕES	41
3.1.1 MORFOLOGIA	41
3.1.2 ESTRUTURAS MOLECULARES PREVISTAS	42
3.1.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	42
3.2 ESPECTROSCOPIA UV-VIS CONVENCIONAL.....	44
3.3 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	45
3.3.1 ELEMENTOS DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA	45
3.3.2 PRINCÍPIOS DE FUNCIONAMENTO DO ESPECTRÔMETRO FOTOACÚSTICO	47
3.3.3 ACUMULAÇÃO ESPECTRAL.....	49
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES	51
4.1 ESPECTROS UV-VIS CONVENCIONAL.....	51
4.2 ESPECTROS PAS	54
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Capítulo 1 – Introdução

Vegetais e frutas são compostos por diversos grupos de moléculas, cada um com sua função específica. Dentre estes grupos temos os pigmentos, compostos responsáveis pela coloração das mesmas. Entre estes pigmentos, temos os flavonoides e os carotenoides. Neste trabalho foram analisados os carotenoides.

Os carotenoides são muito importantes para as plantas, que produzem os mesmos, e também para nos humanos, apesar de não possuímos capacidade de produzi-los, e, portanto dependemos da ingestão destas plantas para suprir nossas necessidades. Além de suas propriedades terapêuticas e antioxidantes, os carotenoides também são utilizados na indústria como corantes. Desta forma, estudar quais frutas e vegetais produzem quais carotenoides, bem como sua disponibilidade e também qual a melhor forma de extrai-los é de suma importância para que seja possível suprir corretamente os mercados que fazem uso deles, indústrias como a alimentícia e de fármacos.

Para analisarmos os carotenoides necessitamos de técnicas experimentais. Entre as diversas técnicas de espectroscópicas existentes, temos a espectroscopia fotoacústica (PAS). Esta técnica se destaca por conseguir medir sinais em amostras opacas e também em amostras que possuam efeito de espalhamento da luz. Por outro lado, para se realizar uma medida em um espectrômetro comum, a amostra precisa ser preparada, normalmente diluída em algum solvente (etanol, acetona, água entre outros)[2], e este preparo leva algum tempo para que as reações físicas e químicas ocorram, além de também deslocar picos ou até mesmo remove-los do espectro medido[3], contudo, na PAS isso não é um problema, uma vez que a amostra a ser utilizada não precisa de nenhum preparo especial. Estas características tornam a técnica de PAS uma excelente escolha para analisar materiais biológicos, sendo esta uma das técnicas experimentais escolhidas para a realização das medidas desta dissertação. A segunda técnica escolhida para este trabalho é a espectroscopia UV-Visível Convencional, esta é bastante utilizada em trabalhos que visam analisar moléculas como os carotenoides, sendo fácil de achar na literatura para futuras comparações assim ajudando a embasar a pesquisa aqui realizada.

Além das razões já descritas anteriormente, outra motivação para este trabalho é a mesma do grupo de fotoacústica. E esta motivação é: estabelecer a espectroscopia fotoacústica como técnica versátil e não destrutiva, uma vez que analisa espécies orgânicas *in-natura* sem necessidade de preparação da amostra e extração de grupos moleculares, o que tornaria o processo lento e custoso. Desta forma poderemos tornar o espectro fotoacústico um dado padrão para comparação de moléculas.

Esta dissertação é composta por esta Introdução, que é o primeiro capítulo e também por mais cinco capítulos, que serão brevemente descritos a seguir.

O segundo capítulo faz uma breve explicação sobre as teorias dos carotenoides, UV-Visível e PAS que embasam este estudo.

Já o terceiro capítulo contém o detalhamento sobre os materiais e métodos utilizados, o aparato experimental, a configuração e o funcionamento dos espectrômetros.

No quarto capítulo é realizada a análise dos resultados experimentais de PAS e UV-VIS.

Por fim, o quinto capítulo é composto pela conclusão e pelas perspectivas futuras quanto aos carotenoides e os experimentos de UV-Visível e Fotoacústica.

Capítulo 2 – Revisão Teórica

2.1 Carotenoides

Na natureza, os carotenoides podem ser encontrados em fungos, leveduras, bactérias e, principalmente, no reino vegetal. Podem também ser encontrados em animais e humanos, em quantidades padrões nos tecidos do corpo, mas estes não são produzidos e sim obtidos através de alimentação[4].

A diferença nas cores dos vegetais e frutas ocorre devido à concentração de diferentes moléculas que absorvem radiação eletromagnética em diferentes partes da região visível do espectro eletromagnético. Estas moléculas são as clorofilas, os carotenoides e, os flavonoides. Elas são de grande importância para a indústria dos corantes naturais que faz uso deste insumo nas mais diversas áreas. Por outro lado, os carotenoides, ao serem consumidos, apresentam efeitos terapêuticos contra uma gama de doenças. O efeito dos carotenoides em nosso corpo e contra as doenças depende da sua estrutura molecular.

Atualmente por volta de 700 carotenoides naturais são conhecidos[2, 5], destes 50 podem ser aproveitados pelo corpo humano. Além dos carotenoides naturais, carotenoides sintéticos também estão disponíveis[6], estes foram feitos de forma a ser mais facilmente absorvidos pelo nosso organismo, mais estáveis e solúveis em água. Entretanto, apesar de todas estas vantagens, os carotenoides sintéticos são conhecidos por possuírem uma toxicidade alta e também propriedades cancerígenas, fato este que provocou uma grande hesitação entre os consumidores mais atentos com a saúde, com isto, a demanda por carotenoides naturais sofreu um grande aumento[7]. Essa mudança no interesse dos consumidores causou um aumento na procura dos carotenoides naturais, o que gerou um efeito em cadeia, uma vez que a indústria alimentícia passou a necessitar de uma disponibilidade maior de carotenoides que impulsionou os estudos e pesquisas com foco em encontrar fontes ricas em carotenoides, fatores que influenciem sua ocorrência, formas de melhorar sua extração e também novas aplicações medicas[8].

Na tabela 1 a seguir podemos ver algumas aplicações medicas dos carotenoides.

Tabela 1 - Alguns carotenoides e suas aplicações médicas.

Carotenoide	Aplicação medica	Fonte
<i>Luteína e Zeaxantina</i>	Combate a carata e outros males causados pela idade nos olhos.	Krinsky <i>et al.</i> [9]
<i>Licopeno</i>	Redução de risco de infecção no miocárdio.	Arab & Steck[10]
<i>Criptoxantina</i>	Efeito anti-inflamatório; Efeito antioxidante.	Singh <i>et al.</i> [4]
<i>α-Caroteno</i>	Redução de risco de câncer de pulmão.	Singh <i>et al.</i> [4]

2.1.2 Propriedades Químicas

Os carotenoides são moléculas de cadeias longas formadas por 40 Carbonos a partir de oito isoprenos unidos de forma reversa a partir do isopreno central (**Figura 1**)[11]. Conforme o número de ligações duplas aumenta, a molécula se torna um sistema reativo rico em elétrons. Assim, carotenoides de cadeia longa são muito mais suscetíveis à oxidação e isomerização². A organização das ligações duplas nas moléculas determina quais comprimentos de onda serão absorvidos ou refletidos no espectro visível, e desta forma definem a cor do pigmento, ou seja, a molécula presente em uma substância[12]. Os carotenoides possuem três picos máximos de absorção distintos no espectro visível, entre 400 – 510 nm[2]. Praticamente todos os carotenoides são insolúveis em água, possuindo uma alta solubilidade em meios hidrofóbicos, desta forma, solventes corrosivos como hexano, acetona e clorofórmio são comumente usados para solubilizar e analisar a presença dos carotenoides. Mas, como a composição dos pigmentos varia entre organismos e estes pigmentos variam de polaridade³, a sua solubilidade também varia, a forma de extração deve ser escolhida pensando no pigmento que se deseja extrair, ou seja, a utilização de solventes acaba por destruir uma parte dos compostos presentes, no caso os carotenoides[11].

Em termos de estrutura, os carotenoides podem ser diferenciados por diversas características como, a presença de oxigênio nas moléculas, a hidrogenação da cadeia

² Quando a ligação entre dois átomos de carbono não permite que haja rotação entre eles, a posição que os ligantes assumem, em relação aos ligantes do outro átomo de carbono no espaço dá origem a moléculas diferentes. Figura 2.1.2

³ Refere-se à separação das cargas elétricas fazendo com que moléculas ou grupos funcionais formem dipolos elétricos

de carbono, a presença de ciclização⁴ em uma ou ambas as extremidades da molécula com anéis de β -ionona e por fim o comprimento da cadeia principal.

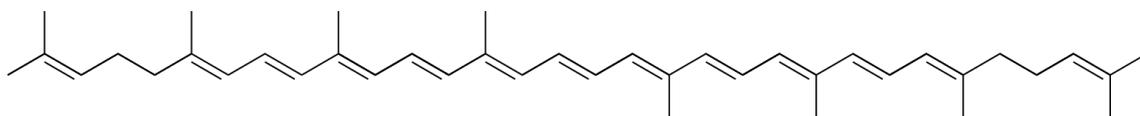


Figura 1 – Forma geral dos carotenoides.

Quando um carotenoide é isomerizado coloca-se uma letra grega antes do seu nome para discrimina-lo, como por exemplo, Alfa (α), Beta (β), Gama (γ) e Delta (δ)[13]. Essas formas isoméricas dos carotenoides determinam o formato e mudam as características da molécula inteira, inclusive sua solubilidade e capacidade de absorção. A forma Trans é caracterizada por sua maior estabilidade termodinâmica, além disso, os carotenoides de forma Trans tendem a passar por ciclização e agregação mais facilmente que os carotenoides de forma Cis. Assim os isômeros Cis são mais facilmente solubilizados, absorvidos e transportados pelo corpo que os isômeros Trans[7].

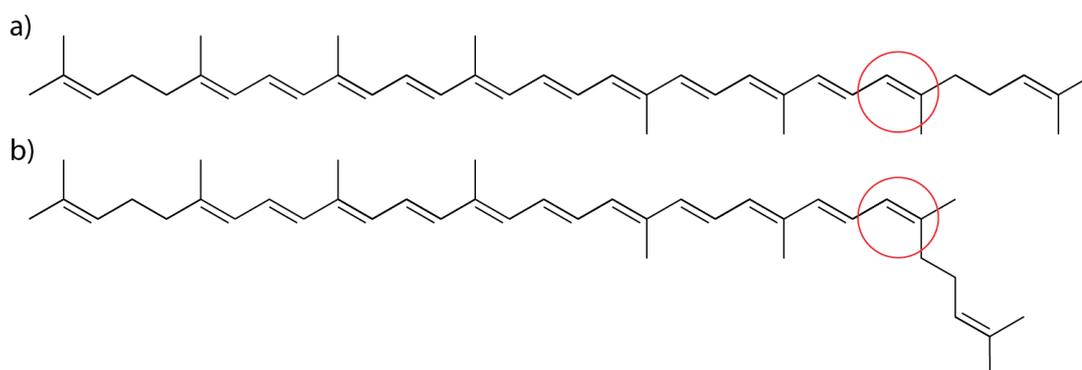


Figura 2 – Ilustração de uma molécula de Licopeno onde ocorre isomeria Trans (a) e Cis (b).

Os carotenoides podem ser classificados em relação a suas estruturas químicas da seguinte forma, carotenoides que são puramente hidrocarbonetos recebem o nome de Carotenos, como α -Caroteno, β -Caroteno e Licopeno, já os que possuem Oxigênio em suas cadeias recebem o nome de Xantofilas, como Criptoxantina, Luteína e Zeaxantina[1, 2].

⁴ Ação de ciclicizar, ou seja, transformar o composto linear em um anel.

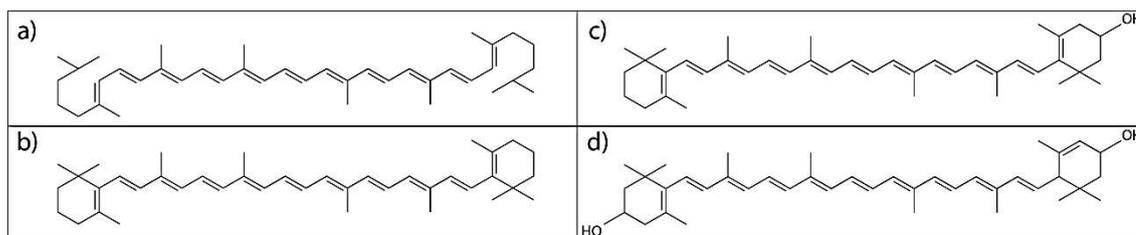


Figura 3 – Alguns dos carotenoides encontrados no nosso corpo.
a) Licopeno; b) β -Caroteno; c) Zeaxantina; d) Luteína.

2.1.2 Morfologia dos carotenoides

Nas plantas, os carotenoides estão distribuídos pelas raízes, folhas, frutos e sementes. Seu armazenamento ocorre nos plastos, sendo estes os cloroplastos (plastos verde), cromoplastos (plastos laranja, amarelo e vermelho), etioplastos (precursores dos cloroplastos) e os leucoplastos (plastos incolores)[14]. Os leucoplastos armazenam os carotenoides incolores: fitoeno e fitoflueno, precursores de todos os outros carotenoides e estão amplamente distribuídos nas plantas. Os carotenoides mais conhecidos possuem cores e estão distribuídos nos cromoplastos, seja em forma livre ou em ácidos graxos esterificados.

2.1.3 Funcionalidades e propriedades

Os carotenoides podem ser divididos em primários e secundários, os carotenoides primários são aqueles que possuem papel fundamental na fotossíntese, conhecidos também como pigmentos fotossintetizantes, estes ficam no comprimento de onda visível do laranja e vermelho e são responsáveis pela transmissão da energia absorvida da luz do Sol pela clorofila[1], já os carotenoides secundários não atuam diretamente durante a fotossíntese, estes se encontram nas folhas das plantas e absorvem luz em comprimentos de onda que não são absorvidas pela clorofila[15].

Os carotenoides que contem um ou dois anéis de β -ionona no final de suas cadeias, como por exemplo α -caroteno e Criptoxantina, são chamados de provitaminas A. Através de processos metabólicos os carotenoides deste grupo se transformam em vitamina A que ajuda no crescimento do corpo, funções visuais, desenvolvimento embrionário e também diferenciação de tecido epitelial[16]. Mesmo com todas essas vantagens, o consumo excessivo de vitamina A é tóxico, e sua dose ideal, para humanos, é baixa. Apesar disso, Stahl & Sies[17] reportaram que cerca de 80% das

nações pobres dependem destes carotenoides para suprir a necessidade de vitamina A.

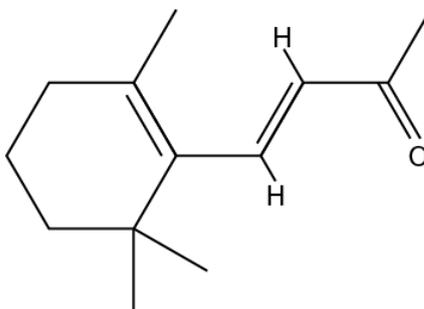


Figura 4 – Estrutura da β -Ionona.

O processo metabólico celular humano gera radicais livres que por sua vez geram os ROS (sigla em inglês para Espécies Reativas de Oxigênio), estes causam danos à maioria das moléculas do nosso corpo, incluindo o DNA[18]. Sendo assim, o efeito antioxidante dos carotenoides pode neutralizar os ROS e também anular o estresse oxidativo no corpo.

Por outro lado, alguns estudos mostram que quando a pressão do oxigênio (pO_2) é alta, os carotenoides sofrem oxidação e perdem o seu papel antioxidante[19]. Além destes efeitos, Singh *et al.*[4] mostrou que altas doses de licopeno e de β -caroteno no plasma humano causaram duas doenças de pele, licopenodermia e carotenodermia, onde manchas alaranjadas e amareladas ocorreram.

2.2 Teorias dos orbitais moleculares

A Lei de Lambert-Beer, como veremos mais a frente, trata do processo externo que acontece com os solutos e solventes, mas também é importante entender o que ocorre internamente nas moléculas, nos átomos e nos elétrons, como estes se comportam dentro do material a ser estudado, para isto precisamos entender um pouco sobre a teoria dos orbitais moleculares.

2.2.1 Estrutura eletrônica de moléculas diatômicas

A mecânica quântica consegue descrever completamente o átomo de hidrogênio, por ser um sistema de um único elétron, da mesma forma, a única molécula que possui uma descrição completa é a molécula hidrogênio H_2^+ quando

ionizada, por também ser um sistema de um único elétron. Para todas as outras infinitas moléculas, algumas aproximações são necessárias para que possamos resolver suas estruturas eletrônicas. Existem basicamente dois métodos para isto, o método da Ligação de Valência e o método do Orbital Molecular. Vamos aqui explicar o método do orbital molecular que se baseia no teorema da variação e na combinação linear de orbitais atômicos (LCAO – *Linear Combination of Atomic Orbitals*).

Os orbitais moleculares do H_2^+ são formados a partir de combinações lineares dos orbitais 1s de ambos os átomos de hidrogênio. Se chamarmos os dois átomos de H_A e H_B , as combinações lineares podem ser escritas como:

$$\psi_{\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}}(\psi_{1sA} \pm \psi_{1sB}) \quad (1)$$

Como a densidade de probabilidade é dada pelo quadrado da função de onda, temos:

$$\psi_{\pm}^2 = \frac{1}{2}(\psi_{1sA} \pm \psi_{1sB})^2 = \frac{1}{2}(\psi_{1sA}^2 \pm 2\psi_{1sA}\psi_{1sB} + \psi_{1sB}^2) \quad (2)$$

Que nos mostra que a densidade eletrônica na região entre os dois núcleos, o termo central, é aumentada com a combinação da função de onda positiva, assim chamamos esta combinação de orbital ligante. Da mesma forma, a combinação negativa diminui a densidade eletrônica entre os dois núcleos, e por isso é chamado de orbital antiligante.

A combinação positiva é uma função g por não mudar o sinal na inversão, enquanto a combinação negativa é uma função u (ungerade) (**figura 5**). O primeiro possui a forma de um elipsoide simétrico e é conhecido como $1s\sigma_g$ já que é formado por orbitais 1s, da mesma forma, o orbital antiligante é chamado de $1s\sigma_u^*$. O asterisco serve para indicar que o orbital é antiligante.

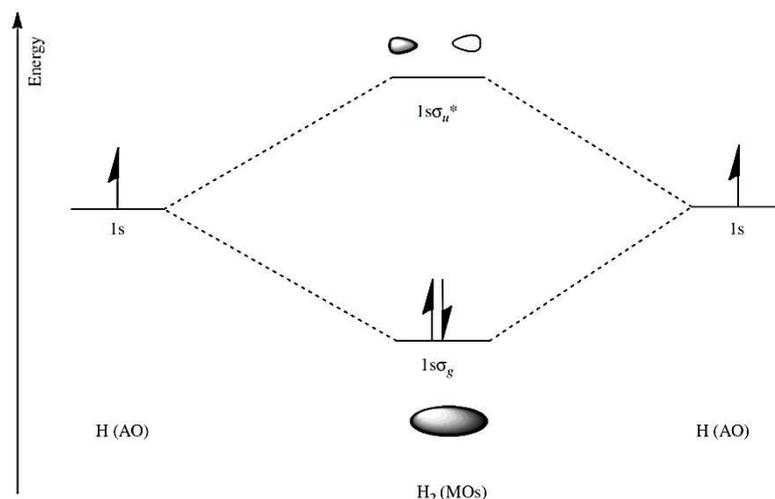


Figura 5– Formação dos orbitais $1\sigma_g$ e $1\sigma_u^*$ a partir de dois orbitais atômicos $1s$, com mais alta e mais baixa energia do que os orbitais que os geram.

Quando dois orbitais de mesma simetria interagem eles geram dois níveis de energia, um com mais baixa energia e um com mais alta energia do que os orbitais constituintes. A redução na energia do orbital ligante é porque agora o elétron sente a atração de dois núcleos ao invés de apenas um, como no caso de orbitais atômicos. O quanto a energia aumenta ou diminui depende da diferença de energia entre os dois orbitais que estão interagindo, da seguinte forma, quanto maior a interação, menor a diferença de energia. É importante perceber que dois orbitais atômicos se combinam gerando o mesmo número de orbitais moleculares.

A interação dos orbitais $2s$ é similar aos do $1s$ produzindo os orbitais $2s\sigma_g$ e $2s\sigma_u^*$ já que $2s$ e $1s$ possuem a mesma simetria.

No caso dos orbitais $2p$, existem dois tipos, aqueles que estão ao longo do eixo entre os núcleos, eixo z , e aqueles que estão perpendiculares, x e y . A combinação dos orbitais $2p_z$ gera os orbitais $2p\sigma_g$ e $2p\sigma_u^*$, mas aqui a combinação negativa (ψ_-) nos dá o orbital ligante e a positiva (ψ_+) o orbital antiligante.

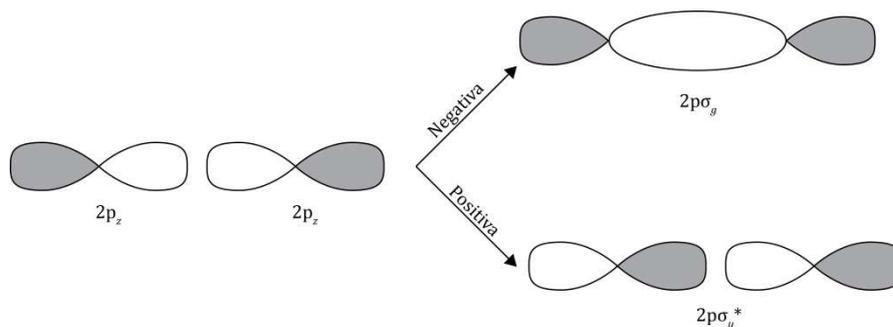


Figura 6 – Formação dos orbitais $2p\sigma_g$ e $2p\sigma_u^*$ a partir da combinação de dois orbitais $2p_z$.

Quanto aos outros dois orbitais $2p$, uma sobreposição direta não acontece e apenas uma lateral é possível. A sobreposição positiva nos dá o orbital ligante $2p\pi_u$ e a sobreposição negativa nos dá o orbital antiligante $2p\pi_g^*$. Outro ponto importante é perceber como aqui u e g denotam orbitais ligantes e antiligantes respectivamente, ser ligante ou antiligante depende apenas se a sobreposição é positiva ou negativa e não nas propriedades g e u da função de onda.

Para o átomo de hidrogênio, a energia de um orbital depende do seu número quântico n , e então os orbitais $2s$ e $2p$ são degenerados. Este formato de “alteres” dos orbitais $2p_z$ é mais efetivo do que o esférico dos orbitais $2s$, e assim os orbitais $2p\sigma_g$ é mais estabilizado do que os orbitais $2s\sigma_g$ e os orbitais antiligantes correspondentes são mais desestabilizados. Já a sobreposição lateral é menos efetiva e, portanto, o orbital $2p\pi_u$ é de mais alta energia que o orbital $2p\sigma_g$. Os orbitais π são duplamente degenerados, portanto um conjunto completo de orbitais π possuem quatro elétrons. O nó do orbital π_u esta no plano que contém o eixo entre os núcleos, não sendo perpendicular a este eixo, portanto o orbital π_u é um orbital ligante, enquanto o orbital π_g é antiligante já que possui além do nó no plano do eixo de ligação, outro perpendicular ao eixo de ligação. Assim, podemos perceber que os orbitais π possuem uma relação com g e u oposta a dos orbitais σ .

2.2.2 Estrutura eletrônica de moléculas poliatômicas

Conforme o número de átomos da molécula aumenta, como esperado, sua complexidade também aumenta. Porém algumas suposições podem ser feitas de forma a auxiliar na interpretação do espectro de moléculas poliatômicas.

1. Regra de seleção de spin:

$$\Delta S = 0 \quad (3)$$

2. Regras de seleção de orbital:

$$\Delta \Lambda = 0, \pm 1; \quad (4)$$

Paridade $g \leftrightarrow u$, com $u \leftrightarrow u$ e $g \leftrightarrow g$ não permitido;

Reflexão $+ \leftrightarrow +$ e $- \leftrightarrow -$, com $+ \leftrightarrow -$ não permitido;

Apesar das regras de spin e paridade se aplicarem a moléculas poliatômicas, as outras regras de seleção são exclusivas para moléculas lineares. Contudo, ainda podemos dividir as regras de seleção para moléculas poliatômicas em orbitais e spin.

2.2.3 Tipos de transições

Como vimos, os orbitais de moléculas diatômicas podem ser classificados como σ, σ^*, π e π^* . Além disto, átomos como *N, O, S e Cl* possuem elétrons não-ligantes (*n*). Com esta nomenclatura, os orbitais de uma molécula poliatômica podem ser descritos como na **figura 7** a seguir.

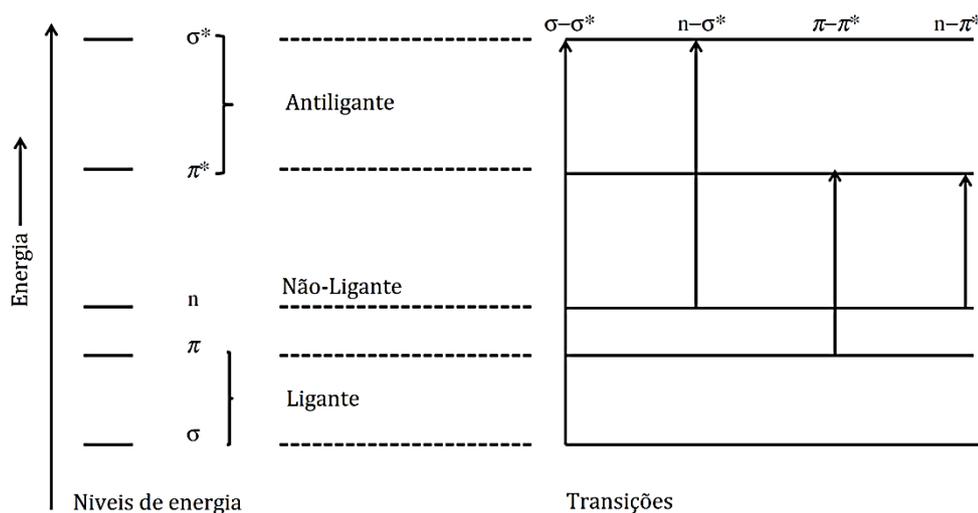


Figura 7 – Níveis de energia molecular eletrônica e principais transições orbitais.

As quatro transições são $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. As regiões aproximadas no espectro eletromagnético podem ser vistas na **figura 8**.

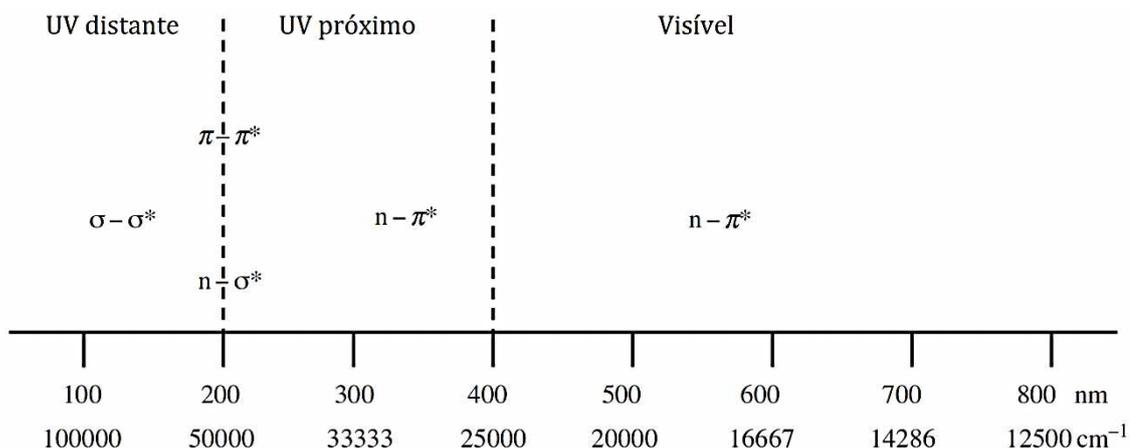


Figura 8 – Visualização das regiões do espectro onde ocorrem transições.

A **figura 8** nos mostra que as absorções acontecem abaixo do limite inferior da maior parte dos espectrômetros (abaixo de 200 nm) para moléculas que possuam apenas transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$, como moléculas do grupo dos alcanos. Esta absorção pode mudar para alcances aceitáveis caso grupos conhecidos como cromóforos⁵ estejam presentes. Os cromóforos contêm orbitais π^* vazios que podem receber elétrons n , σ e π . Cromóforos típicos incluem $C = O$, $C = C$, $N = N$ e NO_2 .

Transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Como podemos observar a partir das figuras anteriores, estas transições envolvem a maior quantidade de energia. Desta forma, os comprimentos de onda correspondente são os menores, $\lambda < 150 \text{ nm}$. Além disso, esta região não é normalmente acessada pelos espectrômetros comuns.

Transições $n \rightarrow \sigma^*$

As transições envolvem a promoção de um elétron não-ligante para um orbital σ^* . O comprimento de onda está entre $(150 - 250) \text{ nm}$. Os coeficientes de absorção molar são baixos. A utilização de solventes polares estabiliza os elétrons não-ligantes de forma que a energia de absorção é aumentada. Esta transição também é pouco observada já que ela ainda se encontra no limite de trabalho dos espectrômetros comuns (abaixo de 200 nm).

⁵ Grupo de átomos responsável pela cor de um composto.

Transições $n \rightarrow \pi^*$

Estas transições são observadas como bandas fracas em moléculas insaturadas que contem heteroátomos como o oxigênio, o nitrogênio e o enxofre. No caso das cetonas e aldeídos estas transições ocorrem devido à excitação de um elétron n do oxigênio para o orbital π^* na parte da carbonila e geralmente ocorre nos comprimentos entre (270 – 300) nm .

Transições $\pi \rightarrow \pi^*$

Aqui as regras de seleção como as que se baseiam em conceitos de simetria, determinam se a transição para um orbital π^* específico é permitida ou não. Em uma molécula com diversos orbitais π , as várias possibilidades de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ levam a um espectro no qual varias bandas de intensidade variante são observadas, como no caso do benzeno.

Em moléculas que contem heteroátomos, as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ são as mais importantes transições espectroscópicas. Assim sendo, vamos estudar os efeitos de conjugações e solventes apenas nestas duas.

2.2.4 Efeito da Conjugação

O aumento na conjugação, ou deslocalização de uma dupla ligação, causa um deslocamento na banda $\pi \rightarrow \pi^*$ que se move para comprimentos de onda mais longos (figura 9).

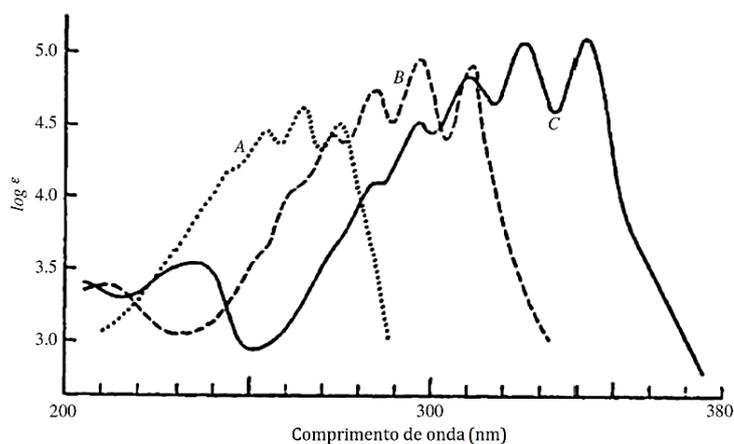


Figura 9 – Espectro UV-Visível de polienos na forma $CH_3(CH=CH)_nCH_3$ com $n = 3,4$ e 5 .

O cromóforo C=C isolado (etileno) tem sua absorção próxima de 190 nm devido a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Quando duas ligações duplas isoladas são trazidas para uma conjugação, ambos os níveis são movidos (**figura 10**) de forma que seu comprimento de onda vai para comprimentos mais longos e sua intensidade diminui.

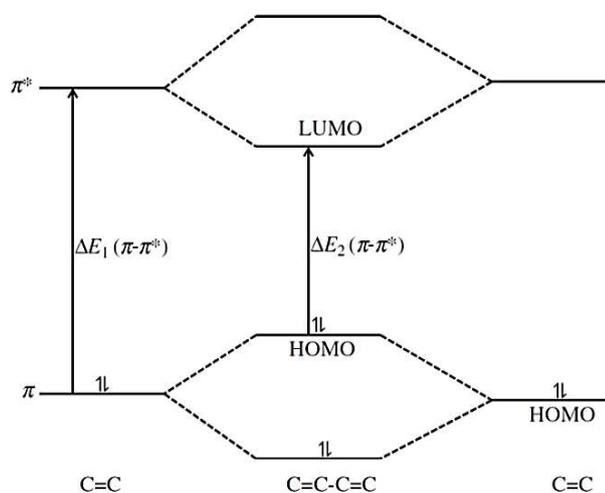


Figura 10 – Diagrama ilustrando o efeito da conjugação nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em hidrocarbonetos insaturados.

Nas transições $n \rightarrow \pi^*$ a presença de conjugações também move as transições para comprimentos mais longos de onda. O orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO, sigla no inglês) π^* é movido para baixo e a absorção $n \rightarrow \pi^*$ é movida para uma energia mais baixa resultando em um deslocamento na transição $n \rightarrow \pi^*$ para maiores comprimentos de onda. Uma conjugação maior aumenta mais ainda este efeito, como por exemplo, na acetona a transição $n \rightarrow \pi^*$ ocorre em 279 nm. Essa banda move-se para 327 nm quando a conjugação aumenta no isopropilideno acetona.

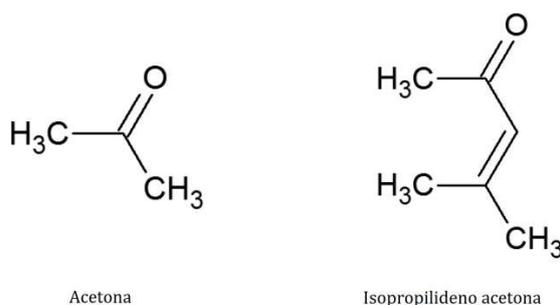


Figura 11– Estrutura de ligações da acetona e do Isopropilideno, mostrando o aumento na conjugação (aumento de duplas ligações).

Quando um número suficientemente grande de conjugações esta presente, a energia do orbital LUMO π^* é reduzida ao ponto em que ν_2 corresponde à região visível do espectro (próximo de 500 nm ao invés de 290 nm).

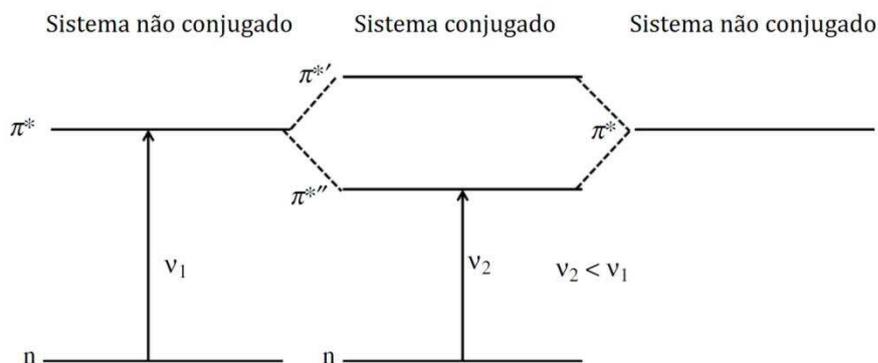


Figura 12- Efeito da conjugação nas transições $n \rightarrow \pi^*$.

2.2.5 Efeito do solvente

A mudança para um solvente mais polar causa um deslocamento para frequências mais altas nas bandas $\pi \rightarrow \pi^*$. Isto ocorre devido ao fato de que o solvente hidrolítico estabiliza o estado excitado $\pi \rightarrow \pi^*$ mais do que o estado fundamental (figura 15).

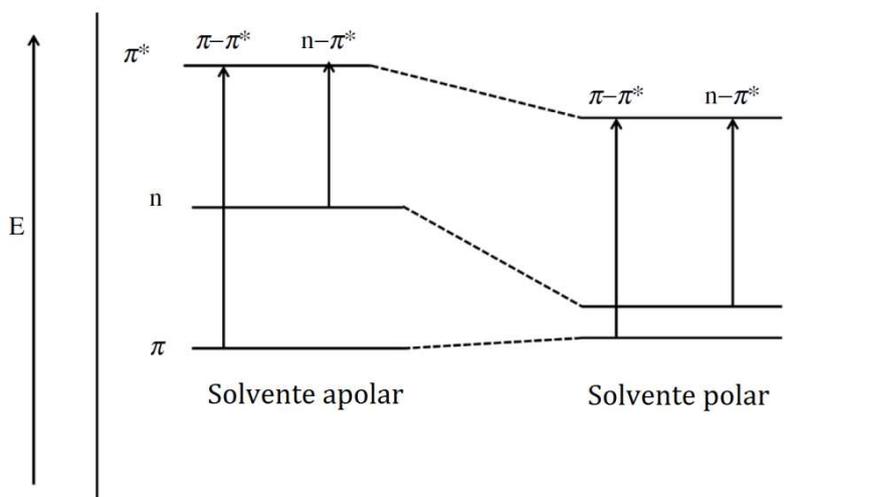


Figura 13 - Efeito de solvente apolar e polar em transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

O efeito dos solventes na posição da banda devido às transições $n \rightarrow \pi^*$ normalmente é o oposto do que ocorre para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (figura 13). Os solventes hidrolíticos estabilizam o nível n , causando um deslocamento para

comprimentos de onda mais curtos. Solventes com ligações H⁶ (hidrogênio) como a água, metanol ou etanol, causam uma estabilização do par solitário ⁷através das ligações H. Este efeito é mais perceptível se o solvente tiver uma constante dielétrica grande e assim, mudanças de até 30 nm no comprimento de onda podem ser observadas. Por exemplo, o $\lambda_{m\acute{a}x}$ para a acetona muda de 279 nm para 257 nm quando mudamos o solvente de hexano para água. O tamanho do deslocamento depende também do momento de dipolo do soluto. Conforme o momento de dipolo do soluto aumenta, também se aumenta o deslocamento. Como por exemplo, a *flavoxantina*, onde $\lambda_{m\acute{a}x}$ muda de 448,5 nm para 446,5 nm quando mudamos de hexano para metanol enquanto que esta mesma mudança de solvente traz uma diferença de 12 nm para a acetona, saindo de 279 nm para 267 nm, uma vez que esta possui um momento de dipolo maior que o da *flavoxantina*.

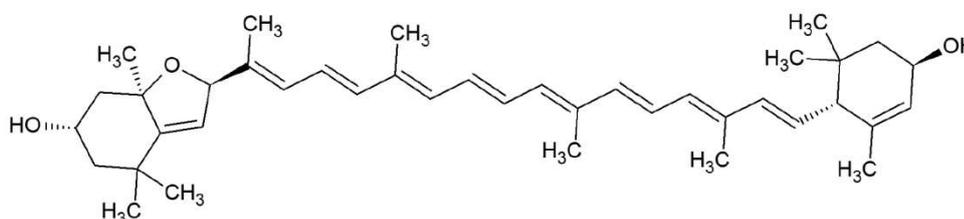


Figura 14 – Estrutura molecular da *flavoxantina*.

2.3 Técnicas de Espectroscopias

2.3.1 A Lei de Lambert-Beer

Para que possamos entender como funcionam as técnicas de espectroscopia, uma lei física precisa ser estudada, esta lei é a lei de Lambert-Beer que é à base das técnicas espectroscópicas de absorção.

De acordo com Kakkar R.[20], a lei de Lambert-Beer (LB) trata da absorção de radiação feita por um material da seguinte forma: A lei de Beer diz que a absorção é proporcional a concentração de moléculas absorventes, já a lei de Lambert afirma que a fração de radiação absorvida é independente da intensidade da radiação, ao combinarmos ambas temos a lei de Lambert-Beer.

⁶ É uma interação entre átomos de hidrogênio de uma molécula com átomos de elementos altamente eletronegativos (ex.: O, F e N) de forma que o hidrogênio sirva como "elo" entre os átomos com os quais interage.

⁷ Um par solitário é um par de elétrons de valência sem ligação ou compartilhamento com outros átomos.

Sendo a **figura 15** uma representação de um material (não opaco) de comprimento l recebendo um feixe de intensidade I_0 .

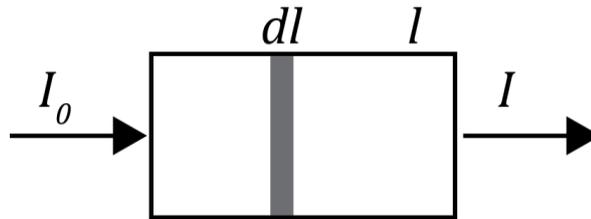


Figura 15 – Absorção de radiação pela solução.

A queda na intensidade, $-dI$, da radiação monocromática conforme ela penetra uma distancia dl (como visto na figura acima), de acordo com a lei de LB, é proporcional a intensidade da radiação I , concentração molar C e a espessura da camada absorvedora dl ,

$$-dI = \alpha I C dl \quad (5)$$

Sendo α uma constante de proporcionalidade, que chamamos de coeficiente de absorção. A lei de LB é universal para todos os tipos de transição. As bandas de absorção geralmente se estendem por certo numero de frequências, devido à vida finita do estado excitado, exceto no caso limite de tempo de irradiação muito alto. Uma complicação adicional no caso dos espectros eletrônicos é que uma única banda de absorção é distribuída entre varias transições vibracionais. Por tanto, o coeficiente molar é uma função das frequências.

$$\alpha(\nu) \quad (6)$$

Então, temos:

$$-dI = \alpha(\nu) I C dl \quad (7)$$

A partir da separação de variáveis e integração com a seguinte condição de contorno: quando $l = 0$ temos $I = I_0$, ficamos com:

$$\frac{-dI}{I} = \alpha(\nu)Cdl \quad (8)$$

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \alpha(\nu)Cl \quad (9)$$

Ou ainda,

$$I = I_0 e^{-\alpha(\nu)Cl} \quad (10)$$

E por conveniência, podemos ainda utilizar o logaritmo na base 10 ao invés do logaritmo natural e com isso teremos:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \frac{\alpha(\nu)Cl}{\ln 10} = \varepsilon(\nu)Cl \quad (11)$$

Onde $\varepsilon(\nu)$ é o coeficiente molar de absorção.

A quantidade A é conhecida como absorvância da solução e pode ser vista diretamente do espectro e normalmente é dado em unidades de *absorvância*, apesar de ser adimensional, já que é o resultado do logaritmo de $\frac{I}{I_0}$.

Além disto, o resultado de $\frac{I}{I_0}$ é chamado de *transmitância* e é expresso em porcentagem.

$$T[\%] = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (12)$$

A grandeza ε é mais útil do que a absorvância uma vez que é independente da concentração e do comprimento do caminho ótico.

A intensidade total da banda é obtida ao se identificar a banda e integrá-la graficamente, resultando no *coeficiente de absorção integrado* $\bar{A} = \int \varepsilon(\nu) d\nu$. Outro método útil é multiplicar a largura à meia altura (FWHM) pelo coeficiente de absorção na altura de transmissão ($\varepsilon_{máx}$) para aproximar o coeficiente de absorção integrado como visto na **figura 16**. Outro detalhe é que como os espectros em sua maioria tem formato gaussiano, um fator multiplicativo de 1,06 é utilizado.

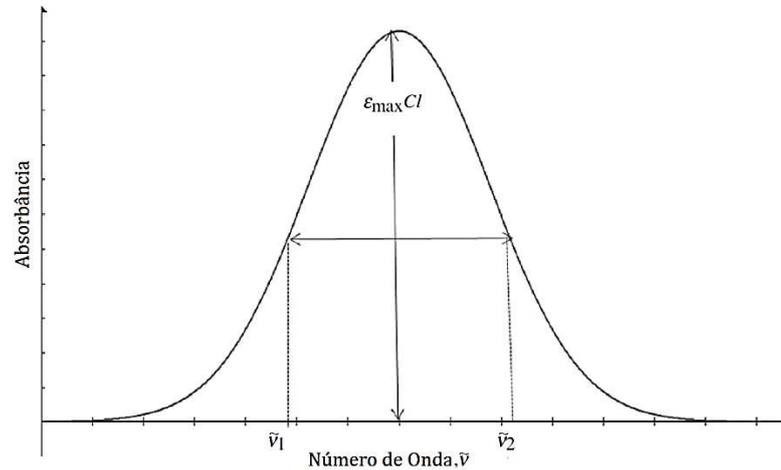


Figura 16 – Espectro de absorção.

2.3.2 A Teoria Fotoacústica

2.3.2.1 Introdução

A espectroscopia é a ciência devotada ao estudo da interação da energia com a matéria. Dentre as formas de espectroscopia, a mais antiga é a espectroscopia ótica. Nesta, a energia esta na forma de fótons com comprimentos de onda variando do raio-X ao infravermelho.

As técnicas de espectroscopia ótica convencionais caem em duas categorias principais: espectroscopia de transmissão e espectroscopia de reflexão. A primeira estuda os fótons que são transmitidos através do material em estudo, a segunda analisa a luz dispersa ou refletida do material.

Contudo, estas técnicas não estão aptas a caracterizar alguns materiais. Materiais estes que possuem uma alta capacidade de dispersar a luz, dentre eles temos os sólidos amorfos, pós e géis. Para tais materiais, técnicas alternativas foram criadas, como o espalhamento Raman, refletância difusa e reflexão total atenuada, entretanto todas estas técnicas sofrem de limitações similares: aplicam-se a um pequeno grupo de materiais ou em apenas um curto intervalo de comprimento de onda.

Além destas técnicas, outra técnica foi desenvolvida na década de 70, técnica esta que é capaz de medir materiais que não são adequados a técnicas comuns de

reflexão e transmissão, o nome dado a esta técnica é espectroscopia fotoacústica (PAS) e ela se diferencia das demais técnicas pelo fato de apesar da energia incidente estar na forma de fótons óticos, o que se detecta e analisa não são fótons, mas sim a energia absorvida pelo material por essa incidência de fótons.

Apesar de a técnica ter sido desenvolvida na década de 70, o efeito responsável por seu funcionamento, efeito fotoacústico, foi descoberto por Alexander Graham Bell no século XIX de forma acidental enquanto realizava experimentos com o Fotofone. Alexander percebeu que ao incidir luz solar numa extremidade sólida de um tubo de audição, era possível ouvir um sinal sonoro na outra extremidade do aparato, mais informações quanto a historia da descoberta do efeito e seus estudos iniciais podem ser vistas em Bell, A. G. (1880)[21].

2.3.2.2 Interação da radiação e mecanismos geradores de calor.

Antes de explicarmos a teoria fotoacústica em sólidos, precisamos entender alguns processos físicos para melhor compreender a ocorrência do sinal fotoacústico.

Primeiro falaremos sobre a interação da radiação com a matéria, uma vez que as técnicas de espectroscopia têm como foco estudá-la. Quando a radiação, no caso, eletromagnética e no alcance do UV-Visível, interage com a matéria, as moléculas saem do seu estado de repouso, mínima energia, e passam para um estado excitado, mais alta energia. O tipo de transição entre os níveis de energia do material depende da radiação (energia) que esta interagindo, lembrando que estes são discretos e respeitam o principio da quantização da energia.

Podemos observar os tipos de transições e suas quantizações na tabela abaixo.

Tabela 2 – As transições e suas respectivas quantizações.

Tipo de Transições	Quantização da Energia
Eletrônica	$E_e = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$
Vibracional	$E_v = h\frac{c}{\lambda}\left(n + \frac{1}{2}\right)$

Onde a Energia Eletrônica, E_e , excita a matéria entre os níveis eletrônicos de energia e é da ordem do UV-Visível, enquanto a Energia Vibracional, E_v é responsável pela geração de calor. Um terceiro tipo de energia, a Energia Rotacional, E_r , não é mostrada na tabela uma vez que sua contribuição para nosso sistema é desprezível devido sua ordem de grandeza muito pequena.

A Energia Potencial Total (E_T) de uma molécula é dada pela soma destas energias, ou seja,

$$E_T = E_e + E_v + E_r, \quad (13)$$

e estas possuem a seguinte ordem e magnitude:

$$E_e \gg E_v \gg E_r \quad (14)$$

Para algumas moléculas, os fótons de UV e luz visível possuem energia suficiente para induzir transições entre diferentes níveis de energia eletrônica, ou seja, permitem que elétrons em níveis de menor energia passem para níveis de mais altas energias. Estas transições possuem bandas de absorção centradas em comprimentos de onda característicos, estas bandas podem ainda ser alargadas devido à possibilidade de varias outras transições com diferentes níveis energéticos ocorrerem, ou seja, os níveis de energia vibracionais e rotacionais se sobrepõe aos eletrônicos.

Após a absorção da energia e excitação do elétron para um nível de mais alta energia, este vai então decair para seu estado fundamental (mais baixa energia), e este decaimento pode ocorrer de duas formas diferentes. A primeira é quando o decaimento ocorre acompanhado da geração e emissão espontânea de fótons ele é chamado de decaimento radioativo. A outra forma de decaimento é chamada de decaimento não-radioativo ou decaimento térmico e é o mais comum, ocorrendo quase em todos os casos que envolvem excitações atômicas e moleculares. Neste tipo de decaimento ao invés da energia ser liberada na forma de fótons, ela é transferida para os átomos e moléculas na vizinhança. Inicialmente a transferência ocorre dentro dos modos vibracionais das espécies vizinhas[22].

Para melhor explicar, vamos usar o seguinte modelo: um estado excitado $|i\rangle$ com energia E_i acompanhada de um conjunto de estados vibracionais $|v\rangle$, espaçados em espaços de energia E_v e que agem como reservatório térmico. Este conjunto de níveis onde o decaimento não-radioativo ocorre é assumido ser da vizinhança mais próxima. A espécie excitada enxerga tais níveis como uma perturbação e descarrega o excesso de energia de forma que estes estados passam a ser excitados e geram modos de vibração com conseqüente geração de calor, ou seja, a energia é transferida ao reservatório térmico e ao invés de gerar fótons gera calor.

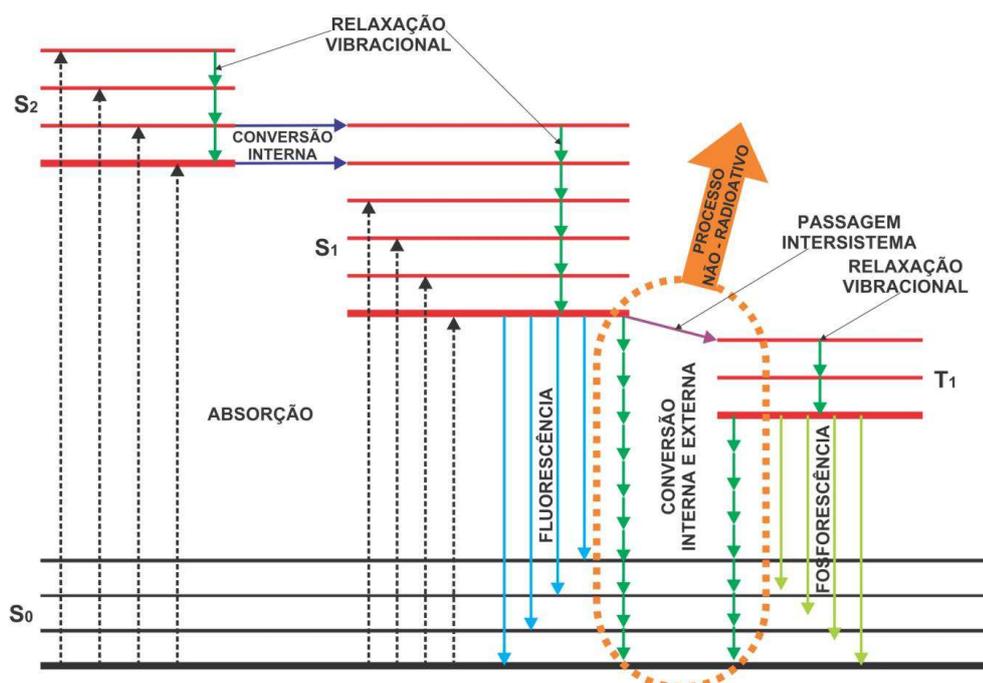


Figura 17 – Formas de decaimento radioativo e não-radioativo.

Agora que entendemos um pouco melhor a interação da radiação com a matéria, vamos falar do segundo ponto importante, os mecanismos de geração de calor, mais especificamente os presentes na amostra.

Ao modularmos o aquecimento de uma amostra, diversos efeitos podem ocorrer, a identificação destes se dá através dos métodos de decaimento.

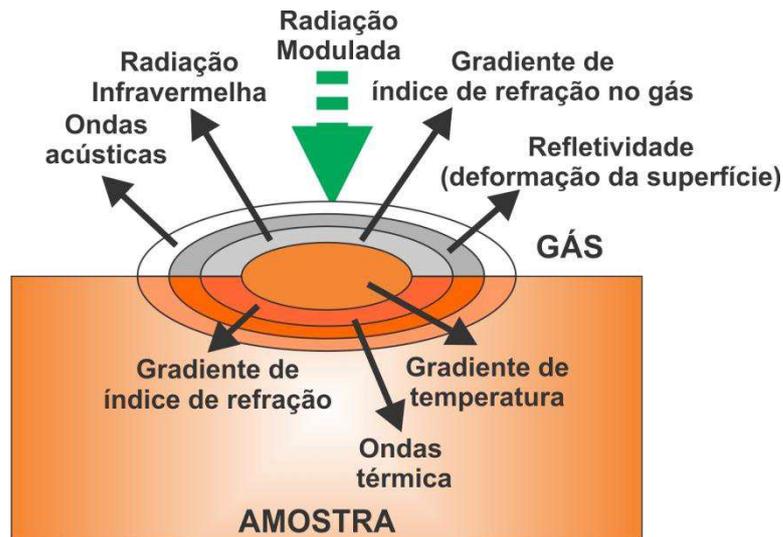


Figura 18 – Efeitos da radiação modulada na amostra.

Cada efeito necessita de uma forma específica de medição para a sua detecção, no caso da fotoacústica, a detecção é feita por um microfone piezoelétrico.

Vamos agora discutir os processos que dão origem aos pulsos de calor.

- **Difusão Térmica:** Aqui, a luz modulada ao incidir na superfície da amostra cria um fluxo térmico que sai da amostra para o gás circundante, provocando uma variação de temperatura na mesma frequência que a da modulação da luz. Somente a camada mais fina do gás próxima à superfície da amostra vai sofrer o processo cíclico de expansão e contração, funcionando como um pistão contra o resto do gás, criando uma onda de pressão que gera o sinal fotoacústico a ser detectado pelo microfone acoplado ao sistema do espectrômetro. Esta é a teoria proposta por Rosencwaig e Gersho[23].

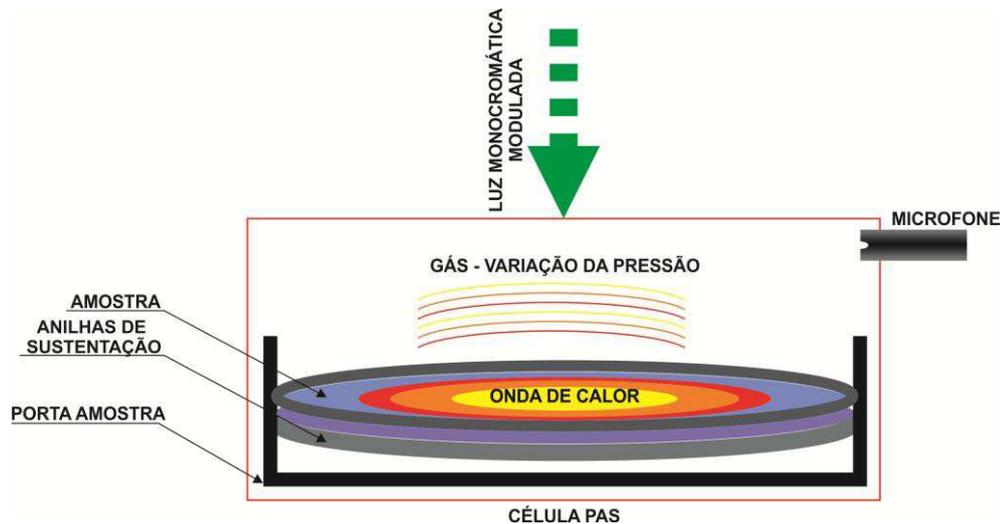


Figura 19 – Ilustração do efeito de difusão térmica.

- **Expansão Térmica:** Na expansão térmica, a absorção periódica de luz causa um aquecimento, também periódico, fazendo com que a amostra expanda-se e contraia-se. Este efeito, também cíclico, se soma ao da difusão térmica. O modelo da expansão térmica foi proposto por McDonald & Wetsel[24].

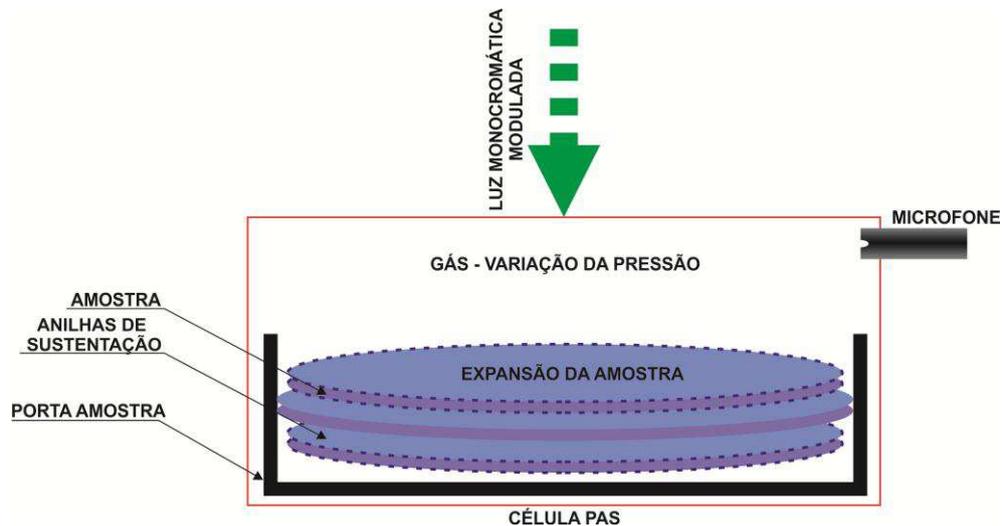


Figura 20 – Ilustração da Expansão térmica.

- **Flexão Termoelástica:** Este efeito ocorre quando existe a formação de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra, estando ela com suas bordas presas. O gradiente ocorre graças ao decaimento na absorção conforme a luz penetra no material. Isto causa diferentes expansões térmicas em diferentes planos (sempre perpendiculares ao gradiente) e isso induz uma flexão na amostra, na direção do gradiente. Como os efeitos anteriores, este

também é periódico e contribui para o sinal fotoacústico. Ele foi proposto por Rousset *et al.*[25].

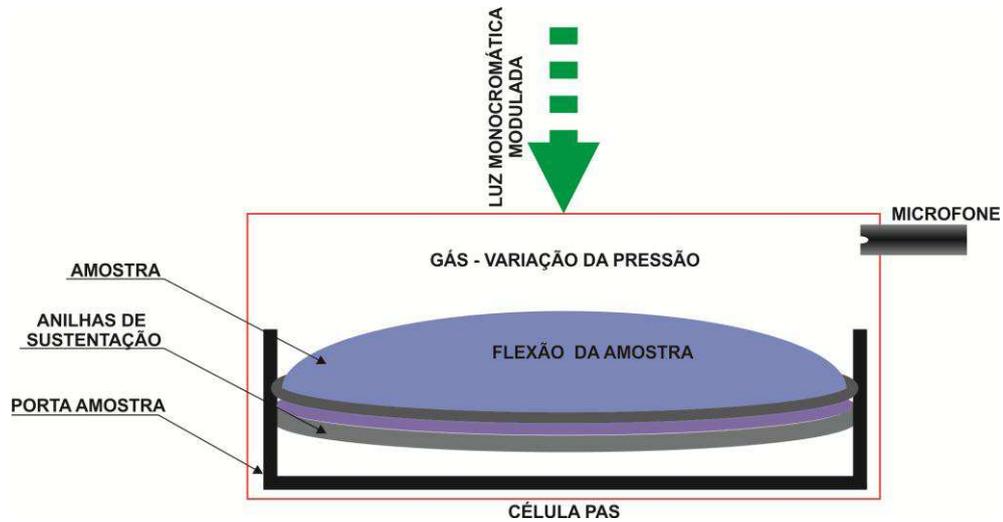


Figura 21 – Ilustração da Flexão Termoelástica.

- Contribuição Fotobárica: Além dos mecanismos anteriores, temos também a contribuição fotobárica que consiste na liberação de gás como no caso de folhas de plantas que podem liberar oxigênio, devido à fotossíntese, ao absorver a luz. Este pode ser um mecanismo que também gera sinal fotoacústico e foi previsto por Poulet *et al.*[26].

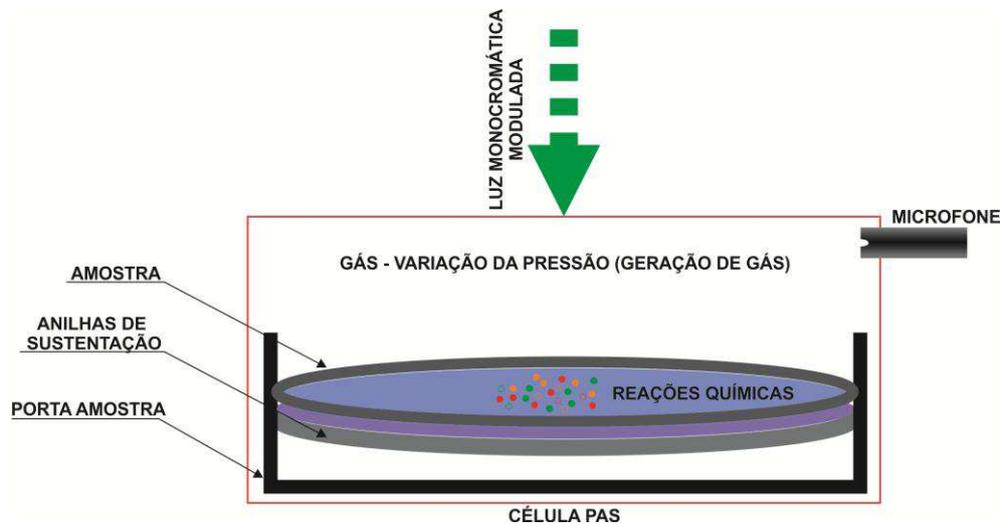


Figura 22 – Ilustração da contribuição fotobárica.

O terceiro ponto são os tipos de medição. Existem três tipos diferentes, a primeira é a varredura em frequência, que possibilita estudar e quantificar as propriedades térmicas do material, a segunda é a varredura temporal, que possibilita analisar a cinética de reações e outros processos que ocorrem no material, como por

exemplo, processos fotoquímicos, a terceira forma é a medição em comprimento de onda que permite a obtenção do espectro de absorção da amostra, este último é o método que foi utilizado neste trabalho, para ele a contribuição mais notável vem da Difusão Térmica e os outros efeitos podem ser desprezados.

Por fim, o quarto ponto, o comportamento dos materiais quanto à luz. Conforme a luz incidente vai penetrando no material, ela vai sendo absorvida e, se atenua de forma exponencial. Quando este feixe atinge uma profundidade máxima, definimos o comprimento de absorção ótica, o qual descreve o comportamento do material. Para melhor entendê-los vamos definir uma espessura l como sendo a espessura máxima do material e l_β como sendo o comprimento máximo de absorção da luz.

O primeiro comportamento é o de materiais óticamente transparentes, neste caso a luz é absorvida por todo o comprimento do material e alguma luz é transmitida através do material, ou seja, $l_\beta \gg l$. O segundo caso é o de uma amostra opaca, aqui a maior parte da luz esta sendo absorvida em uma profundidade muito pequena da amostra e essencialmente nenhuma luz é transmitida, ou seja, $l_\beta \ll l$.

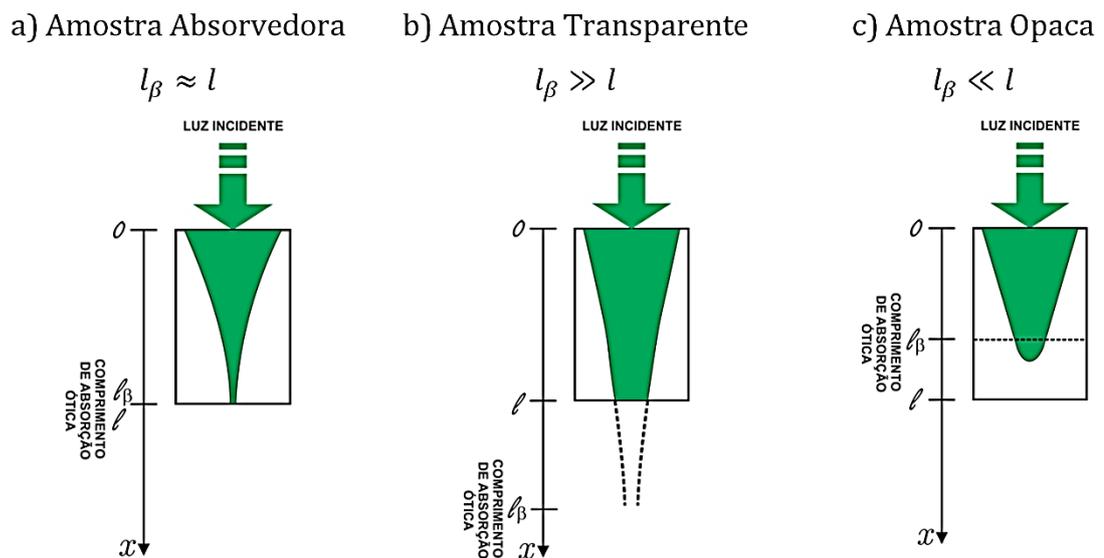


Figura 23 – Ilustração de três diferentes amostras quanto à absorção de luz incidente.

Agora que entendemos um pouco melhor estes pontos, podemos então explicar o efeito fotoacústico.

2.3.2.3 O efeito fotoacústico

Aqui vamos explicar o efeito fotoacústico com base na teoria de Rosencwaig e Gersho (teoria RG), que, como dito anteriormente assumimos ser o efeito de maior influência para a geração do sinal fotoacústico em nossas amostras.

Para melhor entendermos o surgimento do sinal, vamos imaginar uma câmara fechada com uma janela de vidro de quartzo por onde a luz incidente passa. Esta câmara é preenchida por um gás, no nosso caso o ar atmosférico, e ela também possui um microfone piezoelétrico, como já citado, para detectar o sinal fotoacústico. Quando um feixe de luz modulado com frequência FM, frequência esta, escolhida de forma conveniente para cada amostra, incide pela janela de quartzo, ele atinge a amostra, que o absorve e cria um gradiente de temperatura oscilante que, como visto anteriormente, também é modulado com a frequência FM. A partir do processo de decaimento não-radioativo, também explicado anteriormente, a luz que foi absorvida induz na interface amostra-gás o efeito de pistão cíclico contra o resto da coluna de gás, gerando uma onda de pressão detectada pelo microfone, como visto na **figura 24** abaixo.

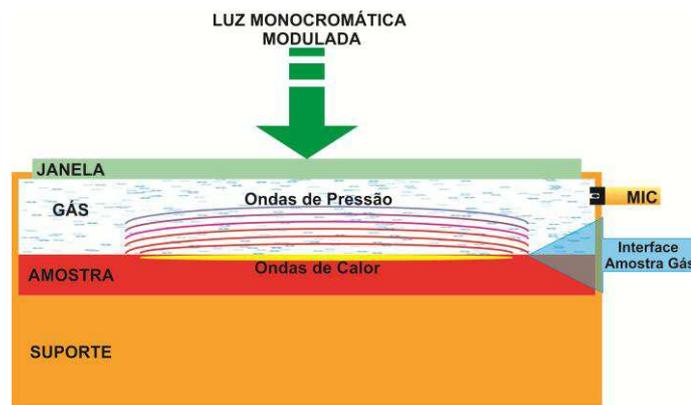


Figura 24 - Ilustração da geração de ondas de pressão, dentro da câmara fechada, onde o microfone as detecta.

A variação de pressão na câmara é proporcional à energia incidente que foi convertida em energia térmica, ou seja, é proporcional ao calor gerado na amostra. Assim, podemos então dizer que a amplitude do sinal acústico medido no microfone é diretamente proporcional com a quantidade de luz absorvida pela amostra.

O sinal fotoacústico tem origem das flutuações de pressão exercidas na coluna de gás acima da amostra, assim, a equação que descreve a variação de pressão periódica está ligada à variação de temperatura na amostra. De acordo com a teoria RG, a solução da equação da difusão térmica é dada por:

$$T(0) = \frac{\beta I_0}{2\kappa_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (15)$$

sendo, $b = \frac{\kappa_b a_b}{\kappa_s a_s}$, $g = \frac{\kappa_g a_g}{\kappa_s a_s}$, $r = (1-j) \frac{\beta_s}{2a_s}$, $\sigma_s = \frac{(1+j)}{\mu_s}$ e os outros termos utilizados na solução podendo ser vistos na tabela a seguir.

Tabela 3 – Parâmetros fototérmicos utilizados.

Parâmetros	Significado	Unidade de Medida
β	Coefficiente de absorção ótica	m^{-1}
r	Coefficiente de reflexão da luz incidente na superfície	Adimensional
l	Espessura	m
I_0	Intensidade da luz incidente	
κ_i	Condutividade térmica	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$
ρ_i	Densidade de massa	$Kg \cdot m^{-3}$
c_i	Calor específico	$J \cdot Kg^{-1} \cdot K^{-1}$
$\alpha_i = \frac{\kappa_i}{\rho_i c_i}$	Difusividade térmica	$m^2 \cdot s^{-1}$
$a_i = \left(\frac{\omega}{2\alpha_i} \right)^{\frac{1}{2}}$	Coefficiente de difusão Térmica	m^{-1}
$\mu_i = \frac{1}{a_i}$	Comprimento de difusão térmica	M
$\sigma_i = (1+j)a_i$	Coefficiente complexo de difusão térmica	m^{-1}
$l_\beta = \frac{1}{\beta}$	Comprimento de absorção ótica	m
Sendo: $i = g, s$ ou b (gás, amostra ou porta-amostra).		

Para obtermos a variação da pressão, considerando-se uma camada de gás entre $x = 0$ e $x = -2\pi\mu_g$, temos:

$$\delta P(t) = \frac{c_p P_0 T(0) \mu_g}{c_v \sqrt{2} l_g T_0} e^{i(\omega t - \frac{\pi}{4})} \quad (16)$$

Sendo, P_0 a pressão ambiente, T_0 a temperatura média da amostra, c_p o Calor específico à pressão constante e c_v o Calor específico a volume constante.

O Sinal foto acústico é então a componente não temporal desta variação de pressão, tendo intensidade S_F e fase ϕ_F cuja representação no plano complexo é:

$$\delta P(t) = S_F e^{j\omega t} \quad (17)$$

e assim temos que:

$$S_F = \frac{c_p P_0 T(0)}{c_v l_g \sigma_g T_0} e^{j\phi_F} \quad (18)$$

Este é o sinal fotoacústico medido pelo microfone que faz parte da câmara de medição do efeito fotoacústico.

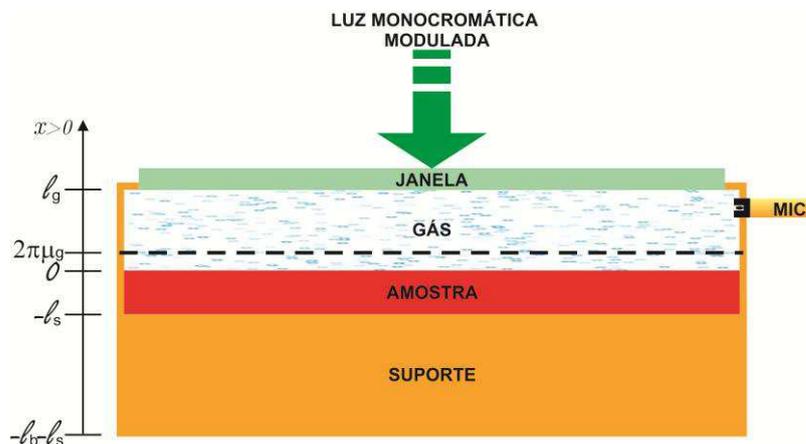


Figura 25 – Explicação da câmara fotoacústica utilizada no modelo RG.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1 Pimentões

Para a realização das medidas experimentais, pimentões (*Capsicum L. annuum*) de seis cores diferentes, amarelo, verde e vermelho, laranja, creme e roxo, foram utilizados. O pimentão foi escolhido como material de análise tendo em vista sua fácil obtenção em diversas partes do mundo, e uma vez que este seja comprovado como uma boa fonte de carotenoides, as indústrias através do mundo poderão tomar proveito disto. Os pimentões utilizados neste trabalho foram adquiridos frescos em mercados locais.

3.1.1 Morfologia

Na **figura 26** podemos ver a ilustração do pimentão fechado e com corte vertical, nela também estão discriminadas as partes do fruto.

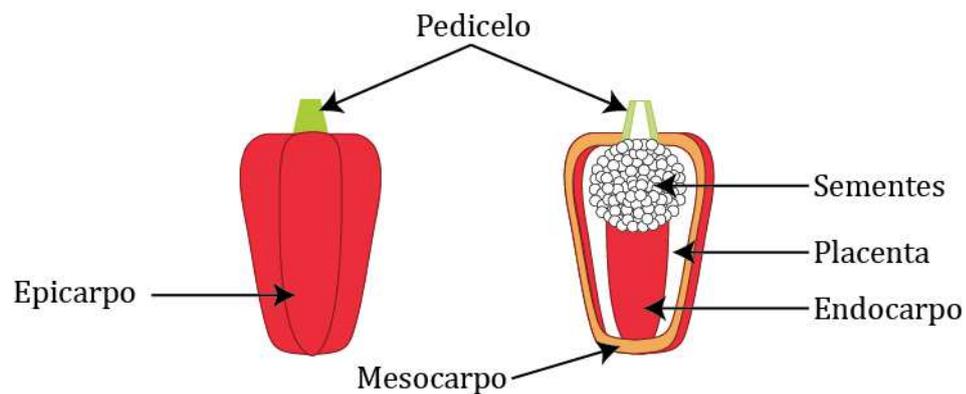


Figura 26 – Ilustração do Pimentão com corte vertical.

O Pedicelo tem como função passar nutrientes para o fruto quando este ainda este conectado a planta, o epicarpo, o que chamamos de casca, seguido do endocarpo, parte intermediária, e o mesocarpo, camada mais interna, estes três compõe o pericarpo, cuja função primária é a de proteger as sementes, além destes temos também a placenta onde se concentra a capsaicina no caso dos *Capsicum* que a possuem e, por fim, temos também as sementes[27].

3.1.2 Estruturas moleculares previstas

A tabela abaixo mostra os carotenoides que de acordo com a literatura estão presentes nos pimentões e também, quando se tem conhecimento, onde estão localizados seus picos de UV-Visível.

Tabela 4 – Carotenoides previstos nos pimentões a serem estudados neste trabalho [2, 28-31].

Caroteno	Solvente	UV-Vis ($\lambda_{m\acute{a}x}$ nm)	P. Verd. [%]	P. Verm. [%]	P. Amar. [%]
<i>β-Caroteno</i>	Hexano	425; 452; 477	13,4	11,6	1,0
<i>α-Caroteno</i>	Hexano	422; 445; 473	0,4	0,2	5,7
<i>Criptoxantina</i>	Hexano	422; 447; 476	0,5	6,7	N/D
<i>Luteína</i>	Etanol	422; 445; 475	40,8	N/D	28,1
<i>Zeaxantina</i>	Etanol	428; 450; 478	0,6	2,3	N/D
<i>Neoxantina</i>	Benzeno	420; 446; 470	15,1	0,7	20,0
<i>Anteraxantina</i>	Benzeno	431; 456; 487	N/D	1,6	15,9
<i>Luteoxantina</i>	Benzeno	405; 429; 458	6,9	0,9	N/D
<i>Violaxantina</i>	Benzeno	424; 450; 483	13,8	9,9	31,3
<i>Capsantina</i>	Benzeno	363; 483; 510	N/D	34,7	N/D

3.1.3 Preparo das amostras

Para a realização das medições dois grupos de amostras foram preparados, no primeiro grupo, utilizado para as medidas da espectroscopia fotoacústica, as amostras *in-natura* foram cortadas em formato cilíndrico com 3 mm de espessura e 9 mm de diâmetro, momentos antes de serem realizadas as medidas, de forma que coubessem no porta-amostras do espectrômetro, sem nenhum preparo adicional, que, como já comentado anteriormente, é um dos diferenciais da técnica PAS.

Já para o segundo grupo de amostras, utilizadas nas medições de UV-Visível, teve um preparo mais complexo, dividido em três etapas como veremos a seguir.

A primeira etapa consistiu da separação do bagaço da fruta para liofilização: após a remoção das sementes, os frutos foram batidos em um liquidificador (**figura 27**) com um filtro de forma a separar o bagaço do suco da fruta, em seguida, este bagaço foi coado, utilizando um coador de tecido, de forma a separar mais ainda a parte líquida da sólida e por fim estes bagaços foram colocados em placas de Petri para que a segunda etapa fosse realizada.



Figura 27– Liquidificador utilizado no preparo das amostras destinadas a medições de UV-Visível. Philips Walita **1000 W**.

Na segunda etapa as amostras foram levadas ao CERTBIO (Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – UFCG / UAEMa) na UFCG, lá elas foram congeladas por 24 horas e então foram colocadas em um liofilizador Liotop L108 (**figura 28**) por 48 horas. Na terceira etapa, as amostras já liofilizadas (**figura 29**) foram pesadas e diluídas em n-Hexano para por fim serem utilizadas para análise no espectrômetro de UV-Visível.



Figura 28 – Liofilizador, modelo Liotop L108 pertencente ao CERTBIO – UFCG, utilizado no trabalho.



Figura 29 – Amostras de pimentão já liofilizadas.

3.2 Espectroscopia UV-Vis Convencional

Para a realização das medidas de espectroscopia UV-Visível, foi utilizado um espectrômetro Varian modelo Cary 50 Bio (**figura 30**) propriedade do Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica da Unidade Acadêmica de Física da UFCG.

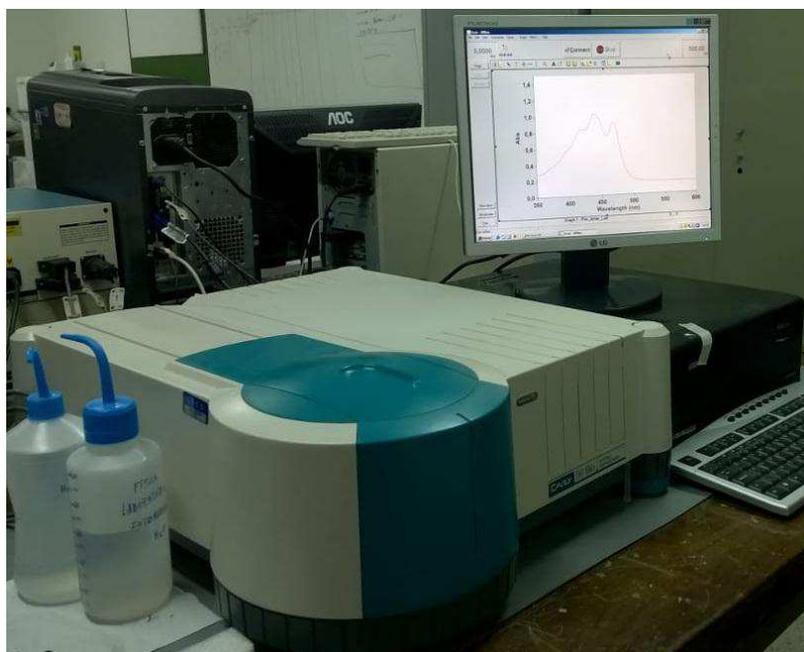


Figura 30 – Espectrômetro Cary 50 Bio utilizado para as medidas.

A **figura 31** ilustra os componentes do espectrômetro UV-Vis, mostrando o caminho percorrido pela luz até passar pelo porta-amostra (cubeta) e por fim chegar ao fotodetector. No modelo utilizado, UV-VIS de feixe único, se faz necessário medir uma vez o solvente puro, de forma a criar um referencial de medida, nosso feixe a 0 % de absorção, feita essa medida, colocamos a cubeta com a amostra que desejada e realizamos a medição, o software do espectrômetro automaticamente realiza os cálculos com base na lei de Lambert-Beer para a obtenção dos dados.

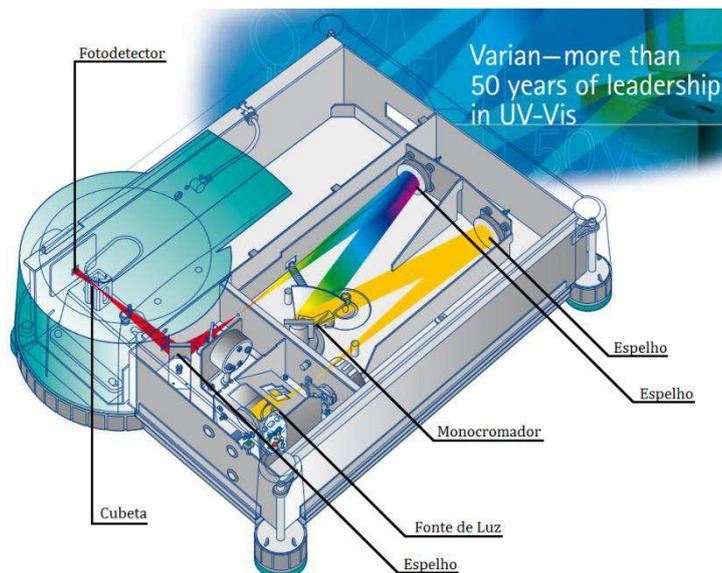


Figura 31 – Esquemática do espectrômetro UV-Vis mostrando o trajeto percorrido pelo feixe até o fotodetector.

Durante nossas medidas as amostras foram pesadas e então diluídas em 5 ml de n-Hexano. A **tabela 5**, a seguir, mostra as massas de soluto utilizadas.

Tabela 5 – Massas pesadas de amostra liofilizada.

Amostra	Massa(g)
Pimentão Vermelho	0,1835
Pimentão Verde	0,2710
Pimentão Amarelo	0,2950

3.3 Espectroscopia Fotoacústica

3.3.1 Elementos de Espectroscopia Fotoacústica

O espectrômetro fotoacústico utilizado para este trabalho, pertencente ao Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica da Unidade de Física da Universidade Federal de Campina Grande, pode ser dividido em três partes, que são: A fonte de radiação e excitação, a câmara Experimental e o Sistema de Aquisição de dados. Abaixo temos a Explicação de cada um dos três.

- *Fonte de Radiação e Excitação*: Composta pelas partes que permitem a obtenção da radiação utilizada na técnica, ou seja, luz monocromática e modulada na região do UV-Visível do espectro eletromagnético.

- Fonte de Potência LPS255SHR;

- Lâmpada de Arco de Xenônio de 1000 W;
- Conjunto de Lentes Colimadoras;
- Conjunto de Filtros: Filtro IR (sistema de circulação de água) e Disco de Filtro com Controle McPherson 747-2 (filtro passa faixa);
- Modulador Ótico (disco com ranhuras na superfície espaçadas igualmente) com Controle OC-4000 PTI de frequência de rotação do modulador;
- Monocromador de Varredura (grade de difração com resolução espacial de 0,7 nm) com Controle de Varredura McPherson 789A-3 (motor de passo).

- *Câmara Experimental*: Composta pelas partes que permitem detectar o sinal fotoacústico, possibilitando a conversão da luz modulada (ótica) em gradiente de temperatura e de pressão na câmara (térmico-acústica).

- Célula Fotoacústica Fechada MTEC 200;
- Pré-Amplificador;
- Porta-Amostras.

- *Aquisição de Dados*: Composto por todos os equipamentos responsáveis por transformar, armazenar e exibir o sinal fotoacústico de maneira que seja possível utilizar os dados obtidos.

- Amplificador Lock-In de dupla fase da Stanford Research Systems modelo SR850 DSP;
- Microcomputador.

A seguir temos o esquema da montagem do equipamento de espectroscopia fotoacústica (PAS) (**figura 32**).

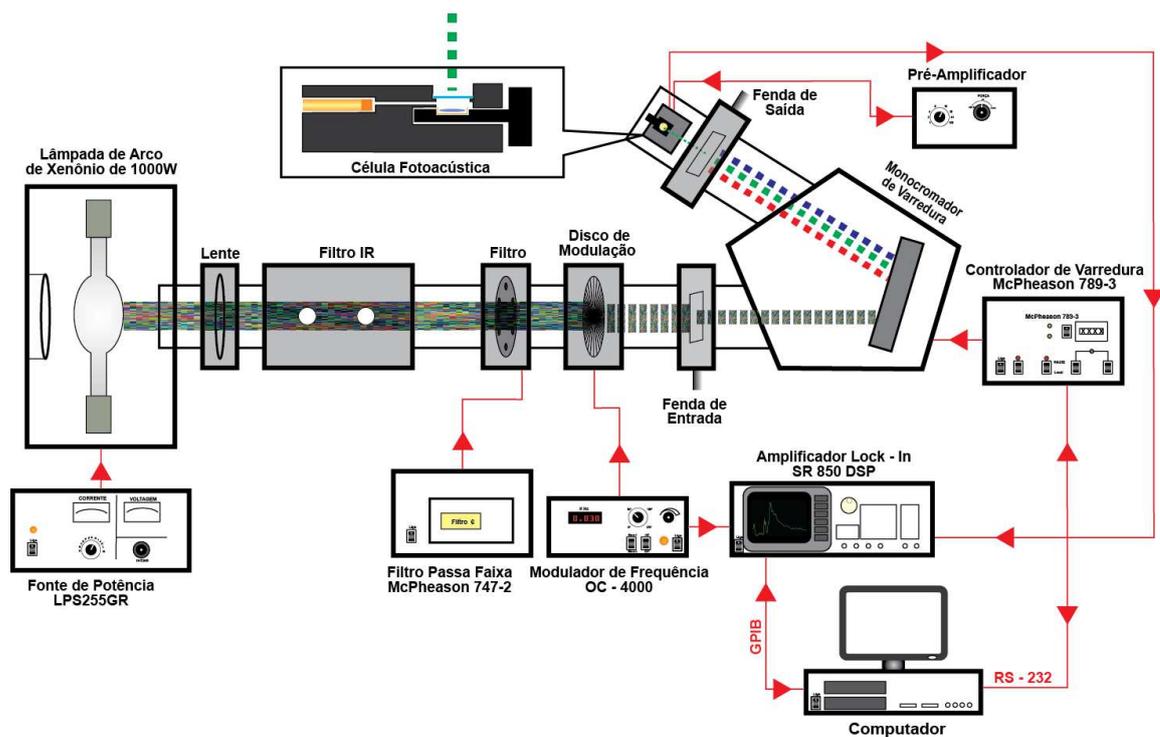


Figura 32 – Diagrama do Espectrômetro Fotoacústico.

3.3.2 Princípios de Funcionamento do Espectrômetro Fotoacústico

Agora vamos explicar melhor o funcionamento dos três grupos, que compõem o espectrômetro, anteriormente citados.

a) - Fonte de radiação e excitação:

Foi utilizada uma lâmpada de arco de xenônio de 1000 W, alimentada por uma fonte de potencia, modelo LPS255HR, que emite radiação de forma quase continua no alcance do UV-Visível entre (200 – 750) nm. A radiação emitida pode ser considerada continua nos comprimentos do UV-Visível e é comumente chamada de luz branca. Após ser emitido pela lâmpada, o feixe de luz passa por um conjunto de filtros, um filtro de infravermelho que é composto por um tubo que possui duas conexões externas com mangueiras que circulam água para dentro e para fora de um refrigerador que retira o calor da luz, ou seja, a parte infravermelha, em seguida o feixe passa por um filtro passa faixa para eliminar os harmônicos de segunda ordem.

Depois destas etapas, a luz é modulada, de acordo com as exigências da técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS). Esta modulação é feita pelo modulador óptico

eletromecânico, modelo OC-4000 PTI, com variação entre (5 – 4000) Hz. O valor da modulação varia de experimento para experimento e é determinada pela teoria de Rosencwaig e Gersho (RG) de 1980. Pela teoria RG, temos que a penetração do sinal na amostra esta ligada a frequência moduladora de forma inversamente proporcional, em outras palavras, quanto maior a frequência de modulação, menor a intensidade do sinal fotoacústico.

Ainda antes de chegar à câmara fotoacústica, o feixe de luz, agora modulado, passa por duas fendas, uma horizontal e uma vertical, na entrada do monocromador, que servem para dar forma e também controlar a intensidade do feixe de luz. O monocromador é composto por uma grade de difração, com resolução de 0,7 nm, fixa em um eixo móvel, movido por um motor de passo, e controlado pelo controlador de varreduras da McPherson modelo 789A-3. A Luz é então modulada e monocromática agora é utilizada para varreduras de comprimento de onda e assim produzimos o sinal fotoacústico.

b) - Câmara Experimental (Detector fotoacústico):

A luz monocromática e modulada passa através de uma janela de vidro de quartzo da célula fotoacústica, alcançando a amostra fixa no porta-amostra que esta na câmara a pressão ambiente. Quando atingida pela luz monocromática e modulada, como visto, o efeito fotoacústico ocorre, devido ao gradiente de temperatura e efeito pistão das camadas de gás, onde a camada próxima à amostra empurra a camada externa, efeito este que é detectado por um microfone de alta sensibilidade (0,50 mV/Pa), pré-polarizado, que fica na câmara fotoacústica. Com isso, sempre que ocorrer uma transição no UV-Visível, um sinal fotoacústico será detectado (**figura 33**).

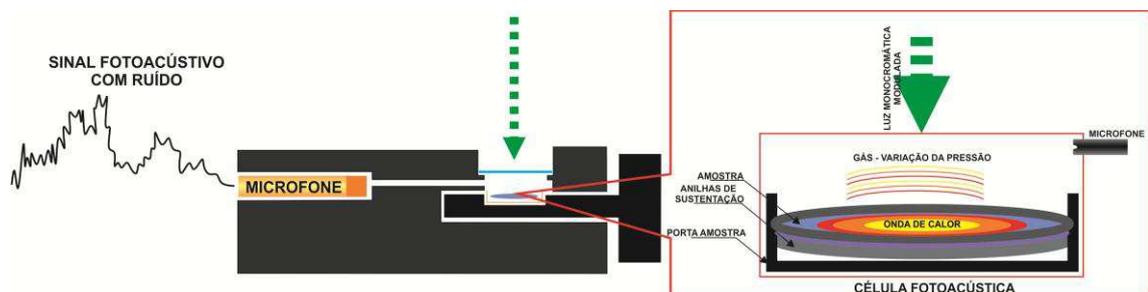


Figura 33 – Detalhes da Célula Fotoacústica e do Sinal Fotoacústico detectado.

O sinal acústico detectado pelo microfone é muito fraco e, portanto, precisa ser pré-amplificado antes de ir ao lock-in, isto é feito convertendo-se o sinal fotoacústico em elétrico e amplificando-o, com isto temos uma melhor relação entre sinal e ruído, (**figura 34**), e então, podemos enviar o sinal resultante para o lock-in. O pré-amplificador vem junto com a câmara e possui diferentes configurações de amplificação que podem ser mudadas de acordo com a necessidade do experimento.



Figura 34 – Relação sinal/ruído no pré-amplificador.

c) - Aquisição de Dados:

Após a pré-amplificação, o sinal é enviado ao amplificador lock-in, modelo SR850 DSP, que faz uma nova amplificação do sinal, além de registrar e enviar os dados para um computador que faz o armazenamento dos mesmos em forma de tabela XY, tabela esta que podemos utilizar para confeccionar os respectivos espectros de PAS. O computador também é responsável pelo posicionamento do monocromador, ao controlar o motor de passo através de uma conexão RS-232, e pela configuração do Amplificador lock-in, por conexão GPIB. Ambos através de software que possibilita a criação de interfaces virtuais para realização de experimentos, ao controlar múltiplos equipamentos de forma prática e, neste caso, permitindo a varredura de comprimento de onda para a PAS no computador.

3.3.3 Acumulação Espectral

Como dito anteriormente, a lâmpada de xenônio emite luz branca com intensidade variável em função do comprimento de onda. Assim, faz-se necessária a normalização dos espectros fotoacústicos das amostras para que os efeitos da lâmpada sejam eliminados. Para a obtenção do espectro de emissão da lâmpada utiliza-se um corpo negro (negro fumo ou Carbon Black), em formato de disco, uma

vez que o espectro de absorção de um corpo negro quase perfeito reproduz o espectro de emissão da lâmpada.

Realizou-se um total de 10 medidas com o negro fumo, cada uma delas com duração de 5 min. A partir destas medidas tirou-se uma media do sinal. Para que o efeito do ruído seja minimizado no processo de obtenção dos espectros. É importante notar que o mesmo processo não foi realizado para as amostras de pimentão, uma vez que este processo estava causando modificações no sinal medido, modificações estas causadas por processos fotoquímicos na amostra.

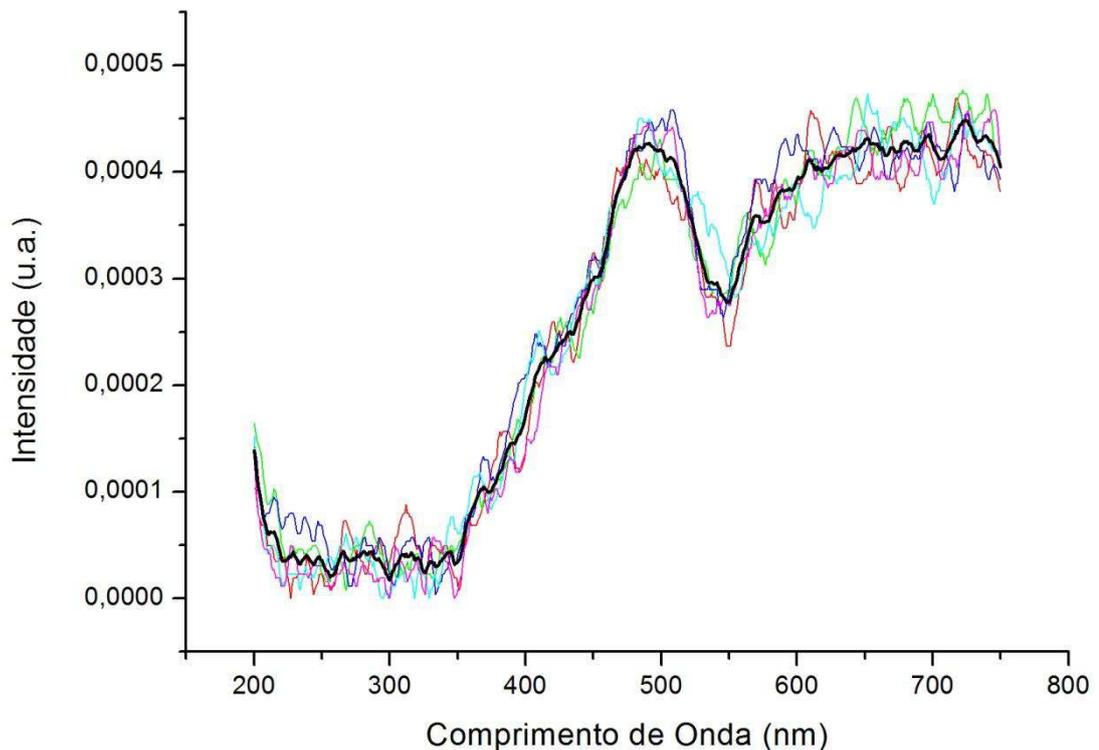


Figura 35 – Espectros PAS acumulados do negro fumo.

O sinal efetivo detectado é dado por:

$$S_{ef} = S_A \cdot S_L \quad (19)$$

Onde S_A e S_L são os sinais da amostra e da lâmpada, respectivamente. Deste modo, ao normalizarmos, obtemos o espectro puro da amostra:

$$S_A = \frac{S_{ef}}{S_L} \quad (20)$$

Capítulo 4 - Resultados Experimentais e Discussões

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos através da técnica de espectroscopia fotoacústica, nas diversas amostras de pimentão. Com base nestes resultados um conjunto de moléculas, do grupo carotenoides, cujas intensidades relativas contribuem para a cor de cada um dos pimentões será proposto. As análises das medidas fotoacústicas foram feitas em conjunto com espectros UV-Vis (convencional), medidos no laboratório de espectroscopia fotoacústica e encontrados na literatura.

4.1 Espectros UV-Vis Convencional

Podemos ver nas **figuras 36 - 38** os espectros obtidos na região UV-Visível seguindo método já descrito no capítulo 3 para o UV-Visível Convencional. A partir destas figuras, podemos perceber que os carotenoides têm três bandas principais de energia na região Visível, com comprimentos de onda $\lambda_{MÁX}$, aproximadamente, entre 400 – 510 *nm*. Além destas bandas, existem picos (bandas) na região UV, não analisados aqui.

Algumas características da espectroscopia UV-Vis (Convencional) são importantes na hora de interpretarmos os espectros obtidos. Como, por exemplo, a necessidade de ter uma amostra translúcida e a baixa resolução que não permite que identifiquemos moléculas com geometria semelhante (isômeras), pelo fato das transições eletrônicas (transições $n \rightarrow \pi^*$) terem energias próximas umas das outras, ou seja, com comprimentos de onda próximos que não podem ser resolvidos.

Para cada pimentão, um conjunto de moléculas, do grupo dos carotenoides, é previsto, de acordo com a literatura (**tabela 4**). Cada molécula possui uma tríade de picos em comprimentos de onda específicos que as identificam, equivalente a uma impressão digital. Entretanto, os espectros UV-Vis obtidos (**figuras 36 - 38**) não correspondem a uma única molécula, mas sim à banda formada pela contribuição de cada molécula presente no pimentão em questão. Podemos perceber isso no espectro UV-Vis da **figura 36**, onde temos o espectro do pimentão verde. Neste espectro

podemos ver três bandas com $\lambda_{M\acute{A}X} \cong (425; 445; 471) \text{ nm}$, ao compararmos com a **tabela 4** percebemos que vários dos carotenoides previstos para esta variação de pimentão possuem comprimentos similares ao obtido, isto ocorre, pois as moléculas possuem estruturas similares, $C_{40}H_{56}O_{n=0,1,2,3,4}$, sendo muitas destas isômeras como, por exemplo, a *Violaxantina* e *Neoxantina* que possuem a mesma forma molecular $C_{40}H_{56}O_4$. Da mesma forma, podemos analisar os pimentões amarelo e vermelho (**figuras 36 e 38**). Assim, os picos 1, 2 e 3 correspondem aos comprimentos $\lambda_{M\acute{A}X}$ das bandas de energia dos pimentões verde, amarelo e vermelho que não tem os mesmos valores devido às diferentes contribuições, ou concentrações, das moléculas de carotenoides presentes. Na **tabela 6**, podemos ver as intensidades relativas dos picos 1, 2 e 3, enfatizando as diferentes contribuições das bandas de energia para o espectro UV-Vis.

Por outro lado, utilizamos o solvente n-Hexano para diluir as amostras liofilizadas, a diluição dos pimentões neste tipo de solvente também contribui para o deslocamento dos $\lambda_{M\acute{A}X}$, devido às propriedades do solvente, como polaridade e constante dielétrica, como discutido anteriormente em 2.2.6.

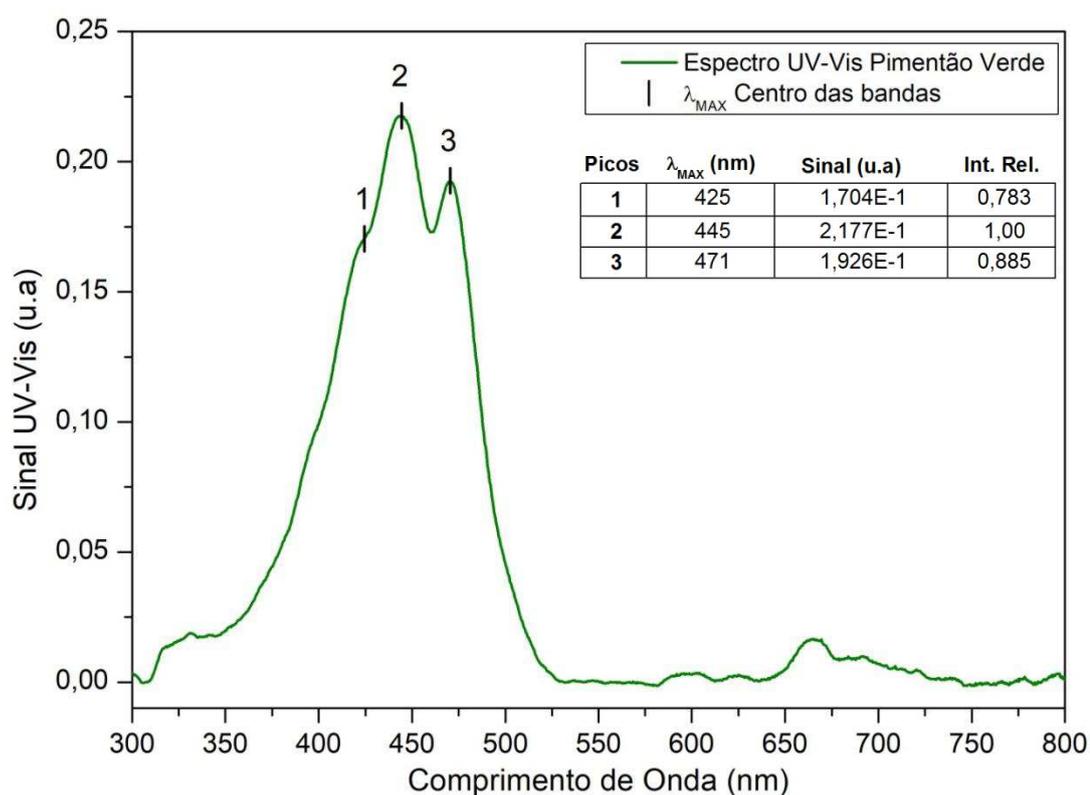


Figura 36 – Espectro UV-Visível do pimentão verde.

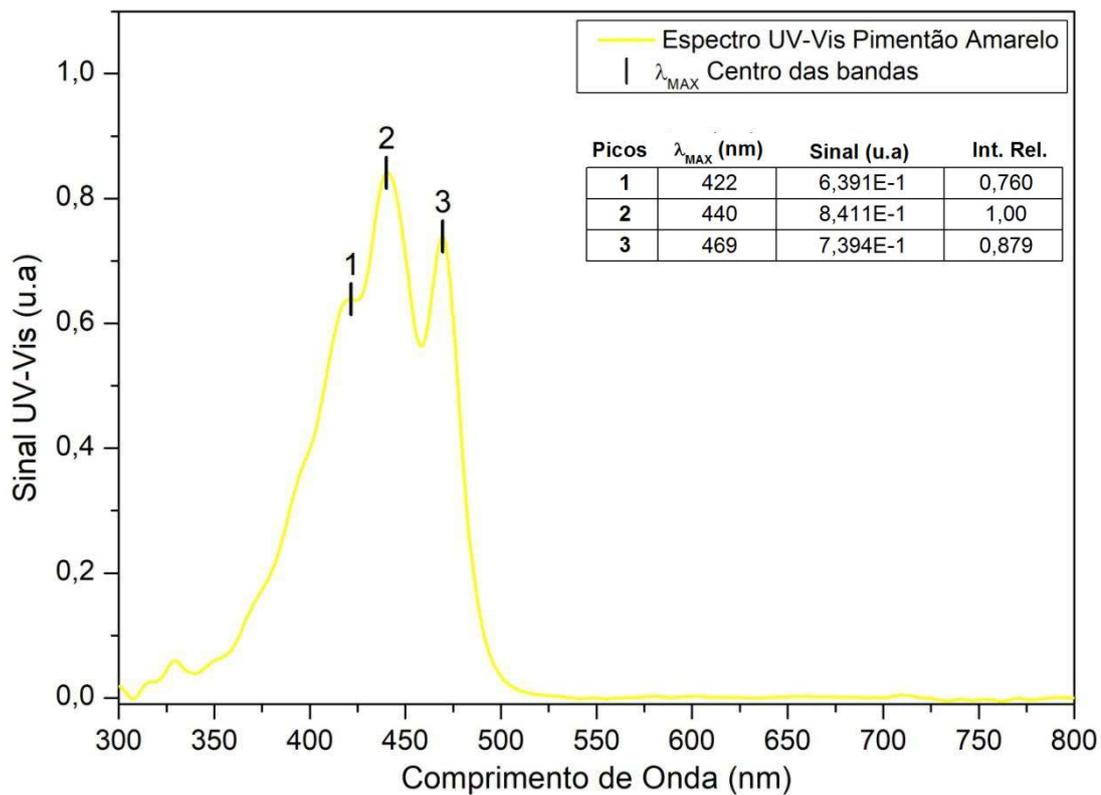


Figura 37 – Espectro UV-Visível do pimentão amarelo.

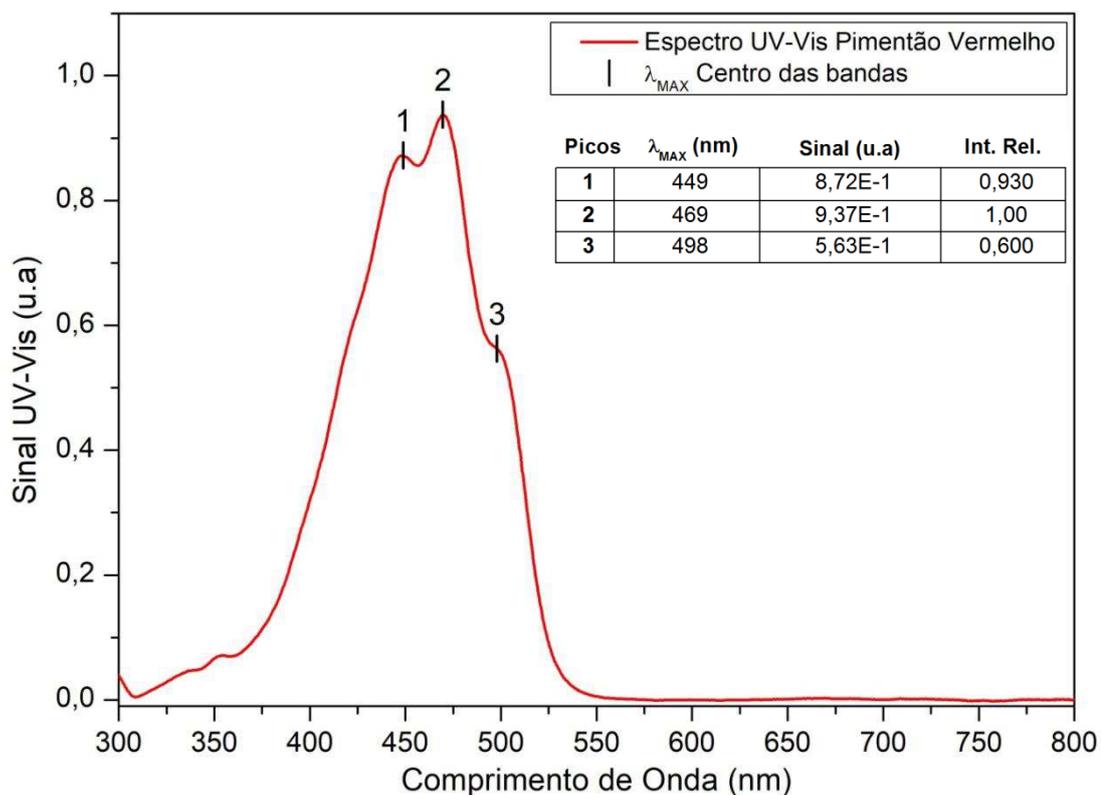


Figura 38- Espectro UV-Visível do pimentão vermelho.

Tabela 6 - Tabela contendo informações dos espectros de UV-Visível dos três pimentões. Contendo o número do Pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Cor do Pimentão	Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
Verde	1	425	$1,70 \times 10^{-1}$	78,30	2,92324
	2	445	$2,17 \times 10^{-1}$	100,00	2,79185
	3	471	$1,92 \times 10^{-1}$	88,50	2,63774
Amarelo	1	422	$6,39 \times 10^{-1}$	76,00	2,94402
	2	440	$8,41 \times 10^{-1}$	100,00	2,82358
	3	469	$7,39 \times 10^{-1}$	87,90	2,64899
Vermelho	1	449	$8,72 \times 10^{-1}$	93,00	2,76698
	2	469	$9,37 \times 10^{-1}$	100,00	2,64899
	3	498	$5,63 \times 10^{-1}$	60,00	2,49473

4.2 Espectros PAS

Os espectros PAS para os pimentões nas cores: creme, verde, amarelo, laranja, vermelho e roxo estão dispostos nas **figuras 39 - 45**. Podemos perceber que o espectro obtido pela técnica de fotoacústica apresenta algumas vantagens em relação às técnicas de absorção convencionais. A medição pode ser feita em todo o alcance do UV-Vis e, portanto obtemos não só os picos de absorção de moléculas do grupo dos carotenoides, mais também de todas as outras moléculas presentes nos pimentões, como por exemplo, os flavonoides que também contribuem para a cor nos alimentos, mas estes não são o foco deste trabalho. Não vamos discutir os detalhes das cores dos pimentões já que para isto seria necessário estudar todas as moléculas que absorvem no visível e estamos analisando uma região restrita da radiação eletromagnética do visível, (390 - 510) nm, o que prejudicaria a análise de combinação (contribuição dos comprimentos de onda) das cores para formação da cor resultante observada nas amostras.

É importante lembrar que quando uma molécula absorver em algum comprimento de onda visível (frequência) a cor complementar observada é formada por todos os comprimentos de onda não absorvidos na região visível. Além disso, cada comprimento de onda no visível corresponde a uma sensação de cor, porém essa sensação de cor pode corresponder a mais de um comprimento de onda visível, Por exemplo, o comprimento de onda de 580 nm produz a sensação da cor amarela, mas essa mesma cor pode ser percebida por uma combinação de comprimentos de onda de 550 nm com 660 nm, aproximadamente.

Na **figura 39** são mostrados os espectros PAS sobrepostos de todos os seis pimentões, entre os comprimentos de (390 – 510) nm, região das transições eletrônicas no visível das moléculas de carotenoides. Podemos notar que, em todas as seis amostras, os comprimentos de onda $\lambda_{M\acute{A}X}$ dos diversos picos de transições eletrônicas estão basicamente nas mesmas posições e apenas suas intensidades relativas variam, ou seja, as moléculas de carotenoides presentes em todos os pimentões são as mesmas. Além disso, é importante ressaltar que, o fato de um dos picos não estar presente em um determinado espectro PAS, não implica que a molécula correspondente não esteja presente, pois, uma molécula de carotenoide é identificada por mais de um pico, geralmente três e, um dos picos de uma determinada molécula pode ser mascarado por um dos picos das outras moléculas, como verificamos na **tabela 4** onde os valores dos comprimentos de onda são similares para picos de moléculas diferentes.

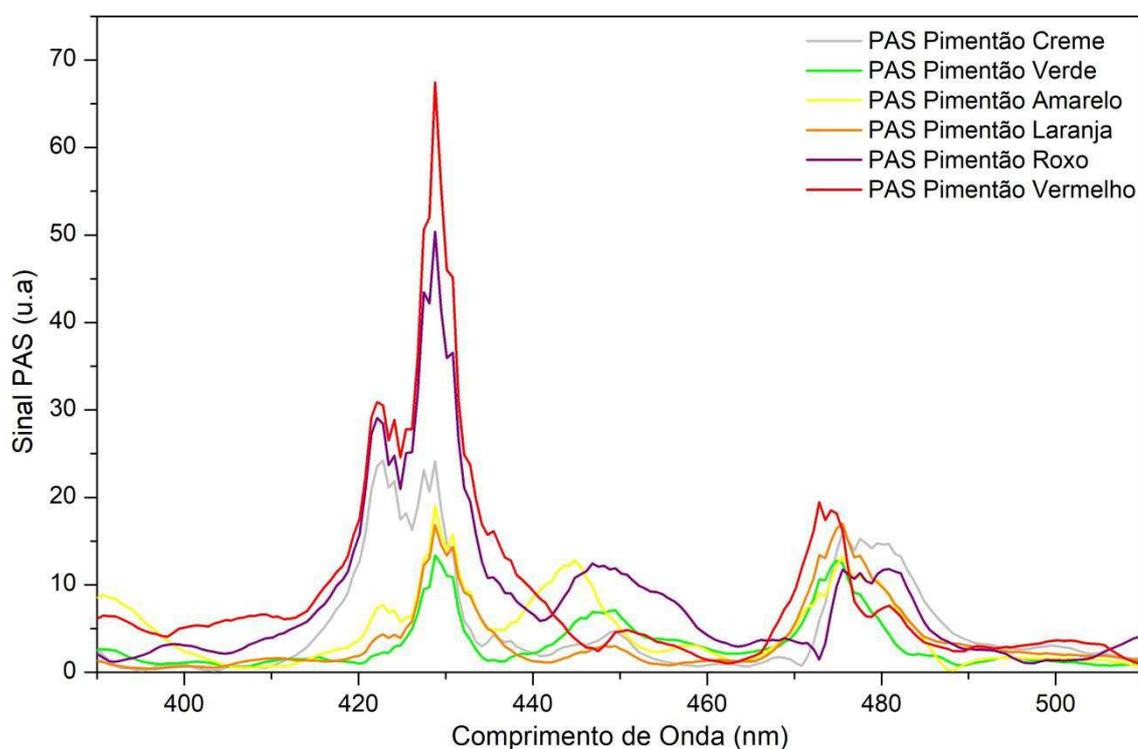


Figura 39 – Espectro Fotoacústico para os pimentões com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Prosseguindo com as análises dos pimentões através dos espectros PAS, a partir dos dados extraídos das **figuras 40 - 45** foram criadas tabelas correspondentes a cada pimentão com os dados de: comprimento de onda de absorção, intensidades absoluta, intensidade relativa e energia absorvida nas transições eletrônicas (**tabelas 7 - 12**).

No espectro PAS do pimentão creme, **figura 40**, foram identificados 20 picos, mostrados na **tabela 7**, com os comprimentos de onda correspondentes. Comparando esses valores com os valores determinado na literatura, **tabela 4**, temos três picos que identificam a molécula *Luteína* (3, 11 e 15), além disso, dois destes picos também identificam a molécula de *α-Caroteno* (3 e 11), não estando presente o 3º pico correspondente a $\lambda = 473 \text{ nm}$, assim, temos a provável contribuição das duas moléculas. Por outro lado, a molécula de *Criptoxantina* tem um pico em $\lambda = 422 \text{ nm}$ (3), mas os outros dois picos que a identificam não estão presentes, dessa forma, podemos dizer que esta molécula estará em concentração de traço⁸ no pimentão creme. Já a molécula de *β-Caroteno* está representada pelos *picos* (5 e 16) onde o 2º pico não foi pôde ser verificado. Seguindo a identificação dos picos, temos as moléculas de *Violaxantina* e *Zeaxantina* com conjuntos de picos (4, 12 e 16) e (6, 12 e 17) respectivamente, onde o pico (12) e (16) são contribuições das duas moléculas. Para a *Luteoxantina* os picos são (2, 7 e 13). As moléculas de *Neoxantina*, *Anteraxantina* e *Capsantina* não tiveram picos conclusivos, no entanto, para a molécula de *Neoxantina* o pico (8) corresponde ao 1ª pico de acordo com a **tabela 4**, ou seja, traços desta molécula estão no pimentão creme.

⁸ Na espectroscopia significa ter pouca contribuição de um determinado espécime, presença fraca, resultando em um pico de muito pouca intensidade.

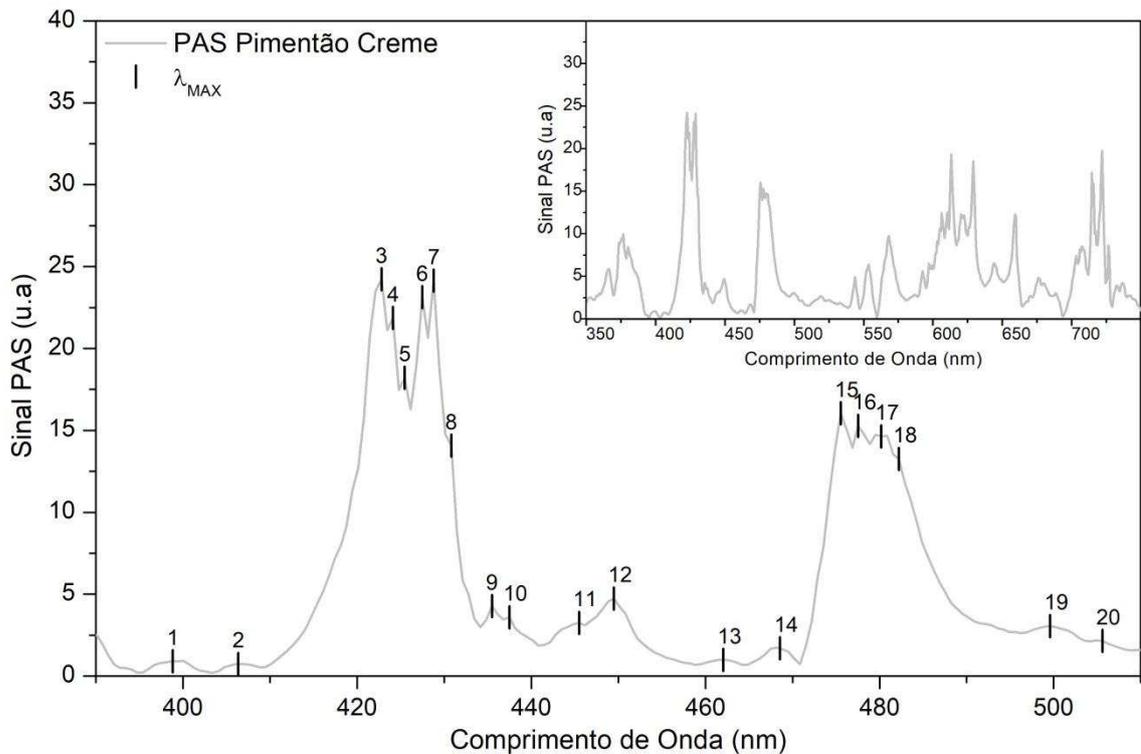


Figura 40 – Espectro Fotoacústico do pimentão creme com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Tabela 7 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão creme, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	399	0,91942	3,80	3,11372
2	406	0,75777	3,13	3,06004
3	423	24,2235	100,00	2,93706
4	424	21,86759	90,27	2,93013
5	425	18,22391	75,23	2,92324
6	427	23,13555	95,51	2,90954
7	429	24,13535	99,64	2,89598
8	431	14,06543	58,06	2,88254
9	435	4,27787	17,66	2,85603
10	437	3,6014	14,87	2,84296
11	445	3,25074	13,42	2,79185
12	449	4,73621	19,55	2,76698
13	462	1,00025	4,13	2,68912
14	469	1,84895	7,63	2,64899
15	476	16,0429	66,23	2,61003
16	478	15,27578	63,06	2,59911
17	480	14,71079	60,73	2,58828
18	482	13,26411	54,76	2,57754
19	500	3,05929	12,63	2,48475
20	506	2,15151	8,88	2,45529

Fazendo o mesmo processo para o pimentão verde, **figura 41 e tabela 8**, foram identificados 19 picos. Desta forma, temos que os três picos que identificam a *Luteína* (4, 10 e 15) e os três que identificam o α -Caroteno (4, 10 e 14) sendo que dois picos são formados pela contribuição destas moléculas (4 e 10). No entanto, a molécula de *Criptoxantina* tem um pico em $\lambda = 422 \text{ nm}$ (4), que esta contribuindo para o 1º pico das duas moléculas anteriores, e tem também o pico (11), mas o 3º pico ($\lambda = 476 \text{ nm}$) não pôde ser identificado, este pode estar sendo mascarado pelos picos (15) e (16) da *Luteína* e *Zeaxantina*, respectivamente, ainda assim, podemos perceber que a contribuição da *Criptoxantina* para o pimentão verde é maior que para o pimentão creme onde apenas um pico foi identificado. Continuando com a identificação dos picos, as moléculas de *Zeaxantina* e *Anteraxantina* têm os conjuntos de picos (5, 12 e 16) e (7, 13 e 17) respectivamente, para os picos (12) e (16) da *Zeaxantina* temos uma contribuição das moléculas de *Violaxantina* e β -Caroteno, respectivamente, que por não apresentarem dois de seus picos destacados, devem contribuir com traços para o pimentão verde. Para a molécula de *Luteoxantina* é visto o pico (6), um dos principais picos do pimentão verde, porém o 1º pico não foi identificado e o 3º pico provavelmente está mascarado pelo pico (13), pertencente à *Anteraxantina*, assim, é provável que esta molécula tenha uma contribuição regular para o pimentão verde. Já as moléculas de *Neoxantina* e *Capsantina* não tiveram picos observados, no entanto, a molécula da *Neoxantina* tem como agravante na sua identificação o fato de ser isômera da molécula de *Violaxantina*.

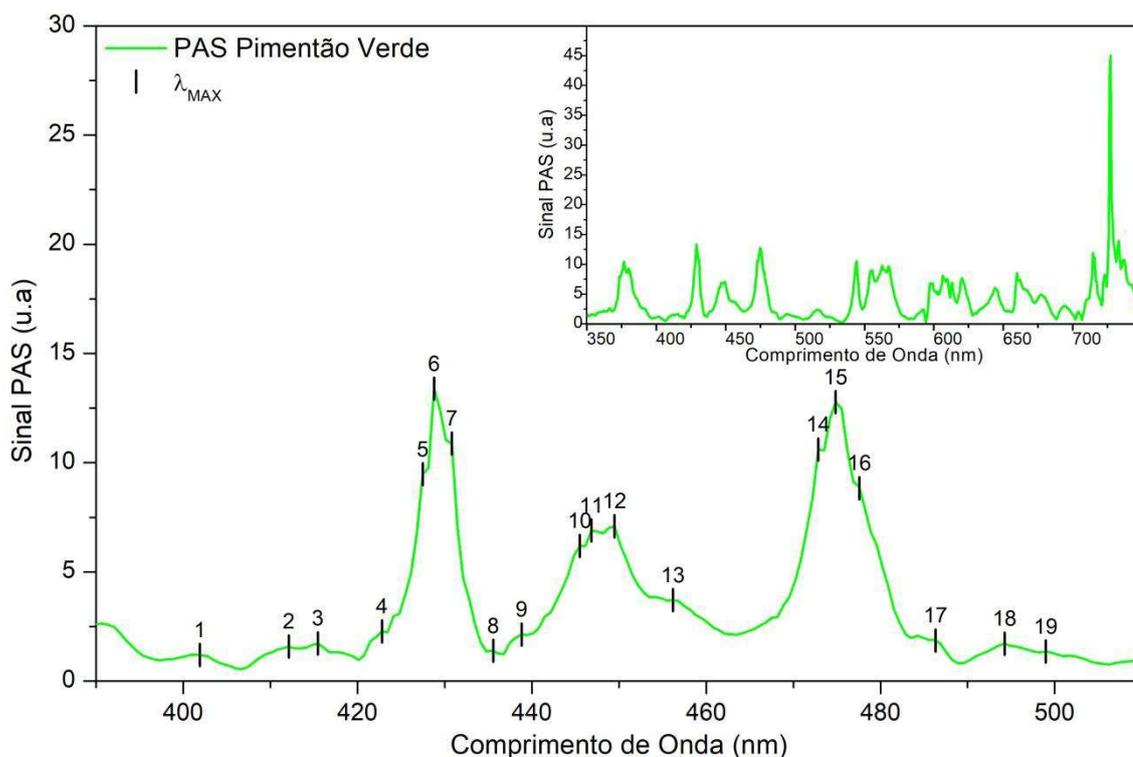


Figura 41 – Espectro Fotoacústico do pimentão verde com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Tabela 8 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão verde, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	402	1,25789	9,39	3,09118
2	412	1,5881	11,86	3,01472
3	415	1,7295	12,92	2,99049
4	423	2,27654	17,00	2,93853
5	427	9,47196	70,75	2,9064
6	429	13,38825	100,00	2,89734
7	431	10,8832	81,29	2,88387
8	436	1,44734	10,81	2,8522
9	439	2,13544	15,95	2,83121
10	445	6,19323	46,26	2,78877
11	447	6,89719	51,51	2,78043
12	450	7,09833	53,02	2,76391
13	456	3,70842	27,70	2,72345
14	473	10,60783	79,23	2,6273
15	475	12,77225	95,40	2,61622
16	478	9,01743	67,35	2,6013
17	486	1,95504	14,60	2,55462
18	494	1,71189	12,78	2,51371
19	499	1,38671	10,36	2,48997

No espectro PAS do pimentão amarelo, **figura 42**, foram identificados 19 picos, **tabela 9**, as moléculas que estão identificadas por três picos são *Luteína* (3, 10 e 15), *α -Caroteno* (3, 10 e 14), *Violaxantina* (4, 11 e 18), *Zeaxantina* (5, 11 e 16), com picos tendo contribuição de duas ou mais moléculas que é o caso dos picos (3), (10) e (11). A molécula de *Criptoxantina* tem o pico (3) que também pertence à *Luteína* e ao *α -Caroteno*, o segundo pico não está presente e o 3º pico ($\lambda = 476 \text{ nm}$) não foi identificado, provavelmente este pico está encoberto pelos picos (15) e (16) que são da *Luteína* e *Zeaxantina*. Entretanto, isto significa que a concentração desta molécula é baixa, isto pode ser comprovado ao olharmos para a tabela 4 que mostra que na literatura também não foi identificado no pimentão amarelo à presença da *Criptoxantina*. Para a molécula de *Luteoxantina* é visto pico (6 e 12) dois picos que tem uma intensidade bem representativa. Em seguida a molécula de *Anteraxantina* que tem uma contribuição muito intensa com o pico (7) apesar dos outros dois picos consecutivos não se fazerem presentes. O *β -Caroteno* está é identificado pelo pico (16), também condizente de acordo com a **tabela 4**, apenas 1% de concentração, o que para o espectro PAS representa uma contribuição em traço, estando os picos (15), (17) e (18) contribuindo de forma mais efetiva para a banda. A molécula de *Capsantina* tem um único pico (18) que é compartilhado com a *Violaxantina*, isso significa uma baixa concentração que está de acordo com a literatura. Na molécula de *Neoxantina* a dificuldade é que ela é uma isômera da molécula *Violaxantina* com a possibilidade dos picos que a representam estarem contribuindo para os picos (3) e (13).

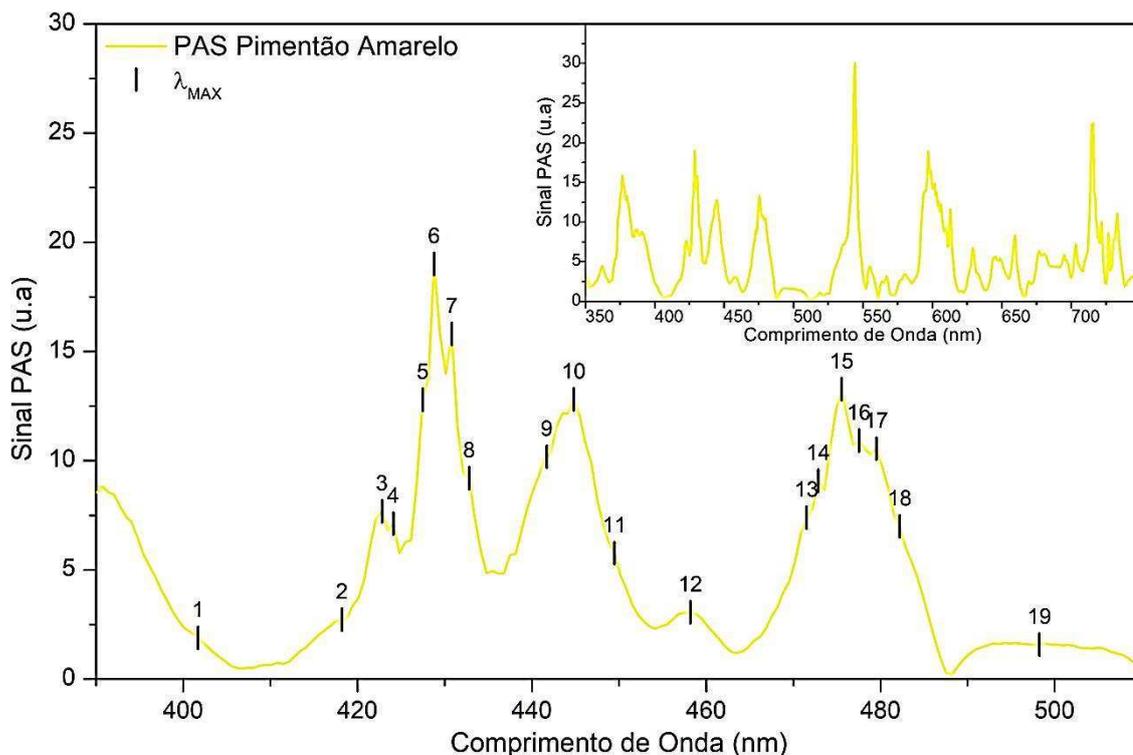


Figura 42 - Espectro Fotoacústico do pimentão amarelo com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Tabela 9 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão amarelo, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	402	1,95188	10,27	3,09049
2	418	2,68844	14,14	2,97219
3	423	7,68436	40,42	2,93706
4	424	7,11689	37,43	2,93013
5	427	12,79908	67,32	2,90954
6	429	19,01175	100,00	2,89598
7	431	15,80374	83,13	2,88254
8	433	9,19451	48,36	2,86923
9	442	10,41493	54,78	2,8108
10	445	12,8015	67,33	2,79185
11	449	5,7674	30,34	2,76698
12	458	3,06807	16,14	2,71261
13	472	7,40119	38,93	2,63215
14	473	9,09243	47,82	2,62659
15	476	13,27719	69,84	2,61003
16	478	10,93287	57,51	2,59911
17	480	10,55813	55,53	2,58828
18	482	6,99259	36,78	2,57754
19	498	1,5836	8,33	2,49473

No espectro PAS do pimentão laranja, **figura 43**, 18 picos foram identificados (**tabela 10**), as moléculas que foram identificadas por três picos são *Luteína* (3, 10 e 14), *α -Caroteno* (3, 10 e 13), *Violaxantina* (4, 11 e 16), *Zeaxantina* (5, 11 e 15), com alguns dos picos tendo contribuição de duas ou mais moléculas, caso dos picos (3), (10) e (11). A molécula de *Criptoxantina* tem o pico (3) também pertencente à *Luteína* e ao *α -Caroteno*, o segundo pico não está presente e o 3º pico ($\lambda = 476 \text{ nm}$) não pôde ser identificado, pois esse pico poderia está mascarado pelos picos (14) e (15) que são da *Luteína* e *Zeaxantina*. Entretanto, caso esta molécula esteja presente, ela tem presença de traço, ou seja, baixa concentração. O que está de acordo com os resultados para o pimentão amarelo, uma vez que em termos de cores estes dois pimentões são vizinhos próximos. Para a *Luteoxantina* temos os picos (6 e 12), dois picos que tem uma intensidade bem representativa. Em seguida a molécula de *Anteraxantina* que tem uma contribuição muito intensa com o pico (7) e o pico (17) com a intensidade relativa bem reduzida, o que mostra que esta molécula tem uma presença maior no pimentão laranja maior que no pimentão amarelo. O *β -Caroteno* é identificado pelo pico (15), mais uma vez concordando com o resultado do pimentão amarelo. Já as moléculas de *Capsantina* tem um único pico (16) compartilhado com a *Violaxantina*, isso significa uma baixa concentração, também de acordo com a literatura. Na molécula de *Neoxantina* a dificuldade é que ela é uma isômera da molécula *Violaxantina* com a possibilidade dos picos que a representa estarem contribuindo para os picos (3) e (13).

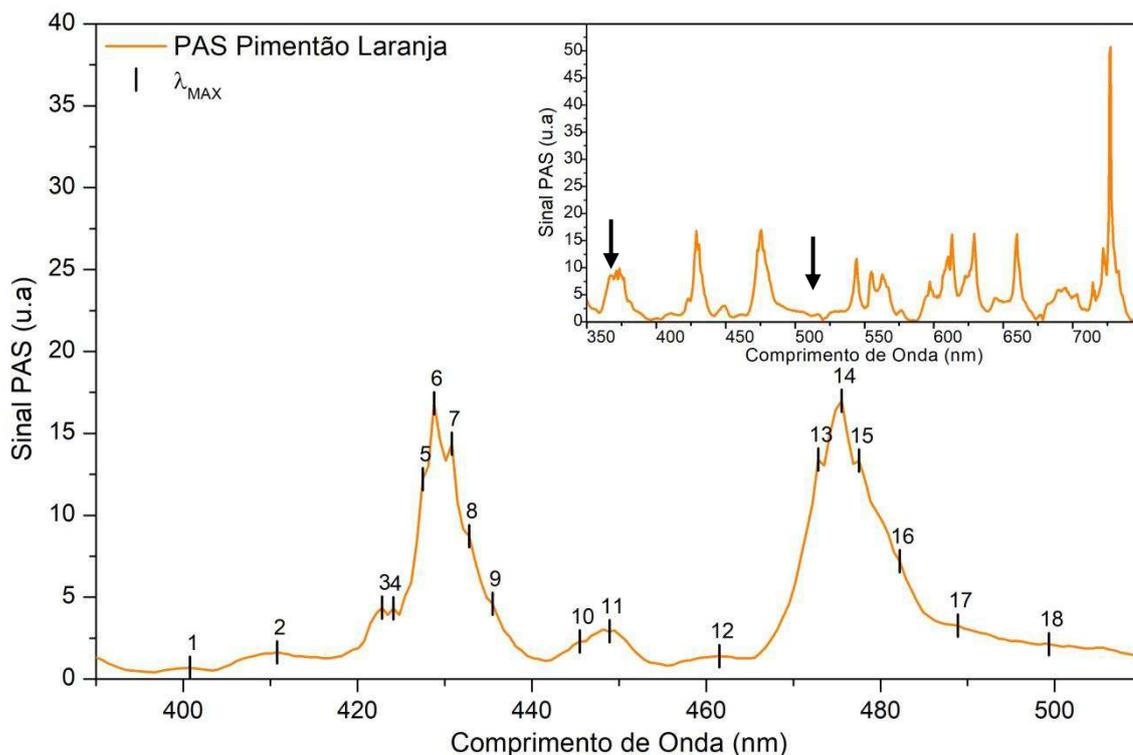


Figura 43 - Espectro Fotoacústico do pimentão laranja com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Tabela 10 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão laranja, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	401	0,68508	4,03	3,09819
2	411	1,63207	9,61	3,02281
3	423	4,37151	25,73	2,93706
4	424	4,32208	25,44	2,93013
5	427	12,2103	71,87	2,90954
6	429	16,83529	99,09	2,89598
7	431	14,36449	84,55	2,88254
8	433	8,73424	51,41	2,86923
9	435	4,59348	27,04	2,85603
10	445	2,29351	13,50	2,79185
11	449	3,02096	17,78	2,76698
12	462	1,40675	8,28	2,68912
13	473	13,40057	78,87	2,62659
14	476	16,99009	100,00	2,61003
15	478	13,33813	78,51	2,59911
16	482	7,19288	42,34	2,57754
17	489	3,36449	19,80	2,54064
18	499	2,18237	12,84	2,48973

Para o pimentão vermelho (**figura 44**), foram identificados 18 picos, **tabela 11**, a única molécula que tem três picos *Violaxantina* (6, 12 e 16), considerando que o pico (16) está um pouco deslocado, quando comparado com os valores do 3º pico adotado anteriormente para os outros pimentões. Na região entre (440 – 485) *nm* ocorreu, globalmente, uma diminuição das intensidades relativas dos picos em comparação com a região de (420 – 440) *nm*, e uma diminuição no número de picos que afetou diretamente os picos das moléculas que contribuíam para os pimentões anteriores, por exemplo: *Luteína* (5 e 15), *α-Caroteno* (5 e 14), *Zeaxantina* (7 e 12), isso indica que as concentrações dessas moléculas são menores. Por outro lado, picos como da *Luteoxantina*, pico (8), ficaram relativamente mais intensos que os demais, contrariando a referência (**tabela 4**). Já para a molécula de *β-Caroteno* temos os picos (6 e 12), um pouco deslocado, devido à baixa intensidade e grande largura da banda. Aqui podemos também perceber o pico em $\lambda = 405 \text{ nm}$, que só foi identificado no pimentão creme. A molécula de *Criptoxantina* tem o pico (5) que também pertence à *Luteína* e ao *α-Caroteno*, o segundo pico não está presente e o 3º pico ($\lambda = 476 \text{ nm}$) não é possível identificar, pois esse pico poderia estar mascarado pela banda do pico (15) da *Luteína*. Em seguida a molécula de *Anteraxantina* que é representada pelo pico (9) que é um ombro do pico (8) o que significa uma contribuição não muito intensa. Para a *Neoxantina* dois ombros com picos (4 e 13) aparecem, que para os outros pimentões a identificação não foi tão visível, assim provavelmente essa molécula está presente nesse pimentão. Já a molécula de *Capsantina* tem o pico (19) compartilhado com a *Violaxantina*, e os outros dos picos mostrados no detalhe da **figura 44**, identificados com setas correspondentes aos comprimentos de onda, aproximados, $\lambda = 363 \text{ nm}$ e $\lambda = 510 \text{ nm}$.

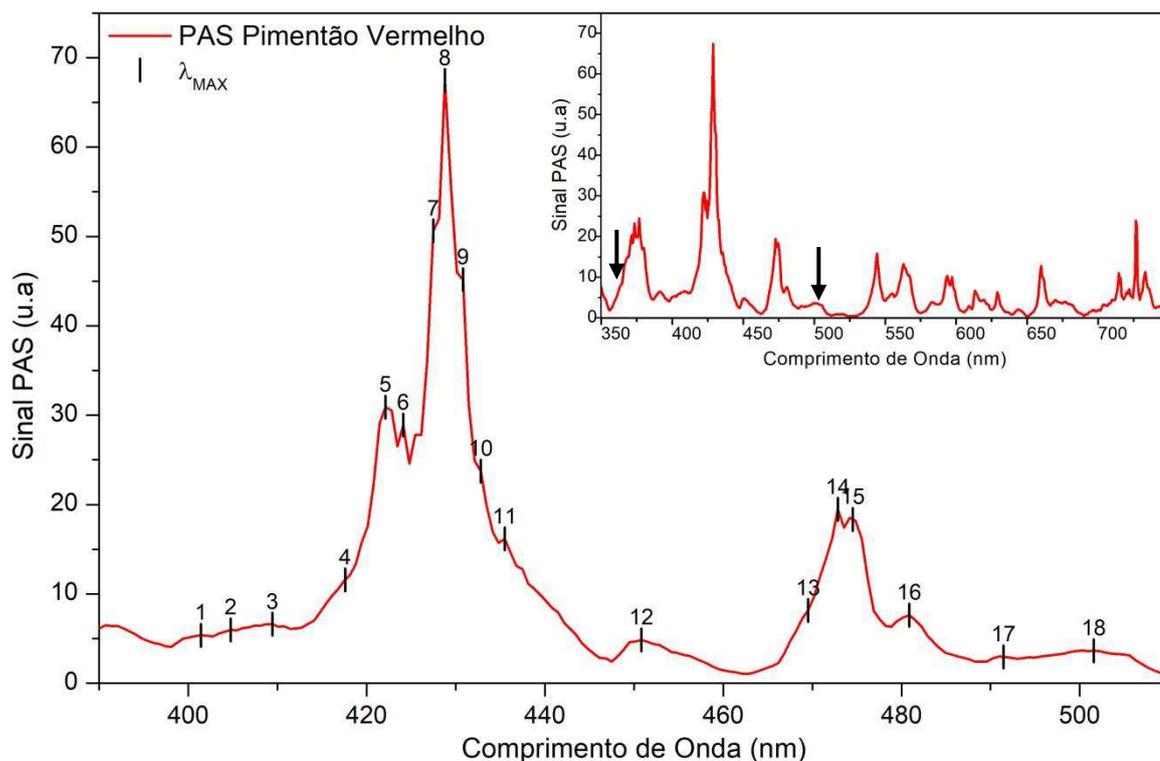


Figura 44 – Espectro Fotoacústico do pimentão vermelho com a região espectral visível que abrange a moléculas de carotenoides.

Tabela 11 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão vermelho, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	401	5,37727	7,97	3,09819
2	405	5,98322	8,87	3,06759
3	409	6,60863	9,80	3,03759
4	418	11,49912	17,05	2,97219
5	422	30,90476	45,82	2,94402
6	424	28,90132	42,85	2,93013
7	427	50,61221	75,04	2,90954
8	429	67,44704	100,00	2,89734
9	431	45,15429	66,95	2,88254
10	433	23,7288	35,18	2,86923
11	435	16,15437	23,95	2,85603
12	451	4,8478	7,187	2,75471
13	470	8,12646	12,05	2,64335
14	473	19,45656	28,85	2,62659
15	475	18,60318	27,58	2,61553
16	481	7,63668	11,32	2,5829
17	491	2,99318	4,44	2,5303
18	502	3,63859	5,39	2,47485

No espectro PAS do pimentão roxo, **figura 45**, foram identificados 21 picos, **tabela 12**, as moléculas de *Luteína* (4, 11 e 18), *α -Caroteno* (4, 11 e 17) e *Zeaxantina* (6, 13 e 19) voltaram a apresentar três picos, ocasionados por uma melhor definição dos picos na região de (440 – 460) nm e na região (470 – 460)nm, mesmo com uma diminuição, global, considerável das intensidades relativas dos picos destas regiões em comparação com a região de (420 – 440) nm similar ao pimentão vermelho. A *Violaxantina* também apresenta três picos (5, 12 e 20), a novidade fica por conta da molécula de *Criptoxantina* que aparece agora com três picos (4, 12, 18). É interessante notarmos que em todas as moléculas acima temos a participação de mais de uma molécula nos picos. Por outro lado, um dos picos da *Luteoxantina*, pico (7), ficou relativamente mais intenso que os demais, contrariando a **tabela 4**. A molécula de *Anteraxantina* tem o pico, (8), com uma boa intensidade relativa e também o pico (18) com a intensidade relativa menor. Esta molécula se mostrou mais presente no pimentão roxo que nos demais. Para a *Neoxantina*, temos (3), um ombro no pico (4), e um pico que possivelmente está mascarado pelos picos (11 e 12) além do pico (16) com uma intensidade relativa pequena. Apesar disso, o pimentão roxo foi quem trouxe essa molécula com a melhor definição de picos. A molécula de *β -Caroteno* além do pico (19), que é o pico central da banda que contem os picos (18 e 20), possivelmente é o pico que contribui menos para banda, tendo a intensidade relativa menor que a dos outros dois picos. Já a molécula de *Capsantina* tem o pico (18) compartilhado com a *Violaxantina*, e os outros dos picos mostrados no detalhe da **figura 46**, identificado com setas correspondentes aos comprimentos de onda, aproximados, $\lambda = 363 \text{ nm}$ e $\lambda = 510 \text{ nm}$.

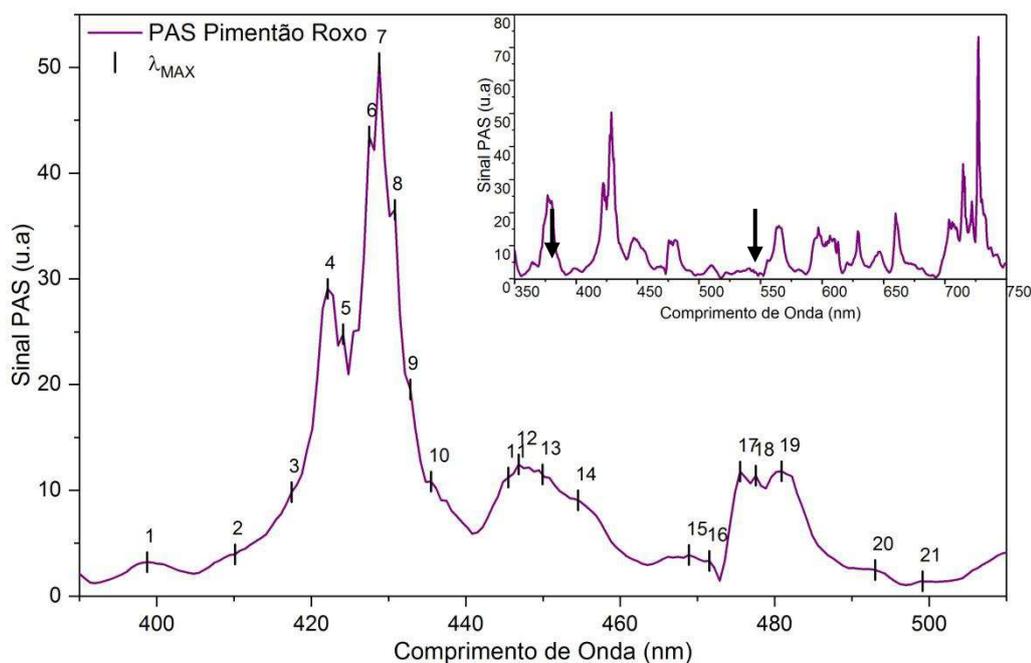


Figura 45 – Espectro Fotoacústico para o pimentão roxo com a região espectral visível que abrange as moléculas de carotenoides.

Tabela 12 - Tabela de dados do espectro fotoacústico do pimentão roxo, contendo o número do pico, o comprimento de onda, as intensidades totais e relativas e a energia da transição calculada por $E = hc/\lambda$, dada em eV.

Pico	λ (nm)	Intensidade (u.a.)	Int. Rel. (%)	Energia (eV)
1	399	3,22002	6,39	3,11372
2	410	3,95243	7,84	3,03018
3	417	9,81757	19,48	2,97932
4	422	29,07844	57,69	2,94402
5	424	24,78186	49,16	2,93013
6	427	43,46272	86,23	2,90954
7	429	50,40597	100,00	2,89598
8	431	36,54671	72,50	2,88254
9	433	19,54244	38,77	2,86923
10	435	10,84389	21,51	2,85603
11	445	11,21827	22,26	2,79185
12	447	12,46621	24,73	2,77936
13	450	11,66961	23,15	2,76083
14	455	9,1273	18,11	2,73049
15	469	3,93155	7,80	2,64899
16	472	3,34388	6,63	2,63215
17	476	11,78216	23,37	2,61003
18	478	11,37892	22,57	2,59911
19	481	11,81312	23,44	2,5829
20	493	2,54231	5,04	2,52003
21	499	1,37535	2,73	2,48973

Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas

A proposta inicial deste trabalho era a de identificar os carotenoides em pimentões *in-natura* e desta forma provar que a técnica de PAS é uma técnica apropriada para feitos similares. Os resultados obtidos mostram que a PAS é, de fato, uma técnica rápida, direta e analiticamente eficiente para os biomateriais, particularmente no promissor campo da fotoquímica e fotobiologia. O espectro PAS bem resolvido obtido para os carotenoides nos dão a identificação de diferentes configurações, mesmo em casos de espécimes muito parecidos.

Assim, a técnica de PAS pode contribuir na seleção e classificação de frutos, folhas e vegetais de acordo com suas propriedades fitoterapêuticas e nutritivas. Permitindo assim que as fontes mais promissoras de moléculas específicas sejam facilmente identificadas possibilitando que as indústrias interessadas saibam aonde encontrar a melhor fonte para atender a demanda necessária.

Até onde sabemos, está foi a primeira vez que a técnica de fotoacústica foi aplicada em pimentões *in-natura* para analisar o grupo dos carotenoides. Fornecendo dados importantes, já que o não uso de solventes bem como a melhor resolução do equipamento permite um espectro na região UV-Visível mais detalhado. Viabilizando a detecção deste grupo e de outros não estudados aqui, grupos estes responsáveis pela coloração de cada um dos tipos de pimentão.

Outro fator interessante que a técnica de fotoacústica nos permitiu determinar é que todas as variações de pimentão possuem os mesmos picos (**figura 40**), variando apenas em intensidade. Desta forma podemos afirmar que todos os pimentões possuem as mesmas moléculas, variando apenas suas concentrações, e, dessa forma mudando a cor do fruto. Este fator não é demonstrado na literatura, uma vez que os trabalhos costumam dizer que determinadas moléculas não estão presentes, não detectadas, em algumas variações do pimentão.

Apesar das técnicas convencionais conseguirem realizar este tipo de análise, foi possível perceber que estas, por usarem solventes em sua preparação além de outras técnicas de preparo, acabam por remover ou deslocar picos das moléculas estudadas,

como identificado pelos picos de UV-Visível da literatura e também os realizados neste trabalho em comparação com os picos PAS. Este problema pode ser sanado ao adicionarmos mais um fator ao nosso estudo, os cálculos computacionais, estes cálculos permitem uma avaliação das moléculas em diversos meios (solventes) e desta forma sabermos onde devemos procurar os picos de cada molécula estudada.

Uma vez que nosso estudo teve como foco apenas o grupo dos carotenoides, e não fizemos uso de ferramentas teóricas, temos algumas expectativas futuras para este trabalho.

As principais expectativas futuras para este trabalho são:

- A realização de simulações computacionais dos espectros UV-Vis, através de métodos como o da teoria do funcional de densidade, o que nos dará a possibilidade de melhor entender a contribuição de moléculas com geometria semelhantes. Possibilitando que tenhamos uma espectroscopia como padrão de amostras *in-natura* que dispensa preparação e melhora a resolução;
- A Investigação das moléculas dos demais grupos funcionais que tem transições eletrônicas na faixa do visível, como por exemplo, os já citados flavonoides, que junto com os carotenoides dão a completa explicação das cores além de também ter uso farmacêutico e na indústria de corantes,
- Aproveitando os cálculos computacionais também cabe o estudo do efeito dos solventes nas amostras medidas e em conjunto com medidas experimentais de UV-Visível convencional e PAS torna possível o entendimento completo do efeito dos solventes em amostras. Permitindo assim sanar as duvidas restantes deste trabalho.

Algumas destas perspectivas citadas já se encontram em desenvolvimento pelo grupo de fotoacústica da UAF – UFCG.

Referências Bibliográficas

1. Flores-Hidalgo, M., et al., *Electronic Structure of Carotenoids in Natural and Artificial Photosynthesis*, in *Carotenoids*. 2017, InTech.
2. Galanakis, C.M., *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*. 2016: Academic Press.
3. Zang, L.-Y., O. Sommerburg, and F.J. Van Kuijk, *Absorbance changes of carotenoids in different solvents*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997. **23**(7): p. 1086-1089.
4. Singh, A., S. Ahmad, and A. Ahmad, *Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review*. *RSC Advances*, 2015. **5**(77): p. 62358-62393.
5. Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Handbook of carotenoids*. 2003: Birkhäuser.
6. Rutz, J.K., et al., *Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food*. *Food chemistry*, 2016. **202**: p. 324-333.
7. Kirti, K., et al., *Colorful world of microbes: carotenoids and their applications*. *Advances in Biology*, 2014. **2014**.
8. Martínez-Hernández, G.B., et al., *Processing, packaging, and storage of tomato products: influence on the lycopene content*. *Food Engineering Reviews*, 2016. **8**(1): p. 52-75.
9. Krinsky, N.I., J.T. Landrum, and R.A. Bone, *Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye*. *Annual review of nutrition*, 2003. **23**(1): p. 171-201.
10. Arab, L. and S. Steck, *Lycopene and cardiovascular disease*. *The American journal of clinical nutrition*, 2000. **71**(6): p. 1691s-1695s.
11. Kuczynska, P., M. Jemiola-Rzeminska, and K. Strzalka, *Characterisation of Carotenoids Involved in the Xanthophyll Cycle*, in *Carotenoids*. 2017, InTech.
12. Choksi, P.M. and V.Y. Joshi, *A review on lycopene—extraction, purification, stability and applications*. *International Journal of Food Properties*, 2007. **10**(2): p. 289-298.
13. Khoo, H.-E., et al., *Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables*. *Molecules*, 2011. **16**(2): p. 1710-1738.
14. Cazzonelli, C.I., *Carotenoids in nature: insights from plants and beyond*. *Functional Plant Biology*, 2011. **38**(11): p. 833-847.
15. Amorim-Carrilho, K., et al., *Review of methods for analysis of carotenoids*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014. **56**: p. 49-73.
16. Handelman, G.J., *The evolving role of carotenoids in human biochemistry*. *Nutrition*, 2001. **17**(10): p. 818-822.
17. Stahl, W. and H. Sies, *Antioxidant activity of carotenoids*. *Molecular aspects of medicine*, 2003. **24**(6): p. 345-351.
18. Kowluru, R.A. and M. Mishra, *Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2015. **1852**(11): p. 2474-2483.
19. Young, A.J. and G.M. Lowe, *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids*. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 2001. **385**(1): p. 20-27.
20. Kakkar, R., *Atomic and Molecular Spectroscopy*. 2015: Cambridge University Press.
21. Bell, A.G., *ART. XXXIV.--On the Production and Reproduction of Sound by Light*. *American Journal of Science (1880-1910)*, 1880. **20**(118): p. 305.
22. Atkins, P.W. and R.S. Friedman, *Molecular quantum mechanics*. 2011: Oxford university press.
23. Rosencwaig, A. and A. Gersho, *Theory of the photoacoustic effect with solids*. *Journal of Applied Physics*, 1976. **47**(1): p. 64-69.

24. McDonald, F.A. and G.C. Wetsel Jr, *Generalized theory of the photoacoustic effect*. Journal of Applied Physics, 1978. **49**(4): p. 2313-2322.
25. Rousset, G., F. Lepoutre, and L. Bertrand, *Influence of thermoelastic bending on photoacoustic experiments related to measurements of thermal diffusivity of metals*. Journal of applied physics, 1983. **54**(5): p. 2383-2391.
26. Poulet, P., D. Cahen, and S. Malkin, *Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1983. **724**(3): p. 433-446.
27. Mendonça, V.L., *Biologia: Os seres vivos*. 2 ed. Vol. 2. 2013, São Paulo: Editora AJS.
28. Sun, T., et al., *Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (Capsicum annuum L.)*. Journal of Food Science, 2007. **72**(2).
29. Davies, B., S. Matthews, and J. Kirk, *The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of Capsicum annuum*. Phytochemistry, 1970. **9**: p. 797-805.
30. Curl, A.L., *Red pepper carotenoids, the carotenoids of red bell peppers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1962. **10**(6): p. 504-509.
31. Curl, A.L., *Bell Pepper Carotenoids, Carotenoids of Green Bell Peppers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1964. **12**(6): p. 522-524.