

ESTUDO DE CAROTENÓIDES E PRÓ-VITAMINA A EM ALIMENTOS

13/93

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DE CAROTENÓIDES E PRÓ-VITAMINA A EM ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a relação final
da tese defendida por Helena Teixeira
Godoy e aprovada pela
Comissão Julgadora em
03.05.93.

Helena Teixeira Godoy A/848
Farmacêutico-bioquímico

Deli A. G.

Dra. Délia Rodriguez-Amaya
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,
para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Délia R. Amaya

Prof. Dr^a Délia Rodriguez-Amaya
(orientadora)

Heloisa M. Cecchi

Prof. Dr^a Heloisa Máscia Cecchi
(membro)

Suplente

Prof. Dr^a Hilary Castle de Menezes
(membro)

Suplente

Prof. Dr^a Marilene De Vuono Camargo Penteado
(membro)

Jorge Mancini Filho

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
(membro)

João Bosco Faria

Prof. Dr. João Bosco Faria
(membro)

Luis Antonio Gioielli

Prof. Dr. Luis Antonio Gioielli
(membro)

Campinas, 03 de maio de 1993.

Ao Eduardo, meu companheiro sobretudo,
às minhas ANAS, por existirem,
a José e Helena, meus pais, pelo amor e dedicação,
a José, meu irmão, pela pessoa incrível que é
e à Clesilda

dedico

À Prof. Dr^a Délia Rodríguez-Amaya, pelo seu
exemplo de pessoa e profissional,
o meu especial agradecimento.

AGRADECIMENTOS

A todos os membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas à redação final da tese.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo apoio financeiro para a realização desta tese.

A Hoffmann-LaRoche pelos padrões de carotenóides cedidos.

Ao Prof. Dr. George Britton, do Departamento de Bioquímica da Universidade de Liverpool, pelos espectros de massa e pela valiosa troca de informações.

Ao Prof. Dr. Paulo A. Bobbio pela utilização do espectrofotômetro em seu laboratório, durante parte do experimento.

À Cecília Gonçalves e Liliane Castro pela colaboração no envio das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos da FEA pelo carinho e auxílio, em especial aos professores e funcionários.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA pela colaboração e apoio prestados durante a elaboração deste trabalho.

À ABIA (Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos) pela colaboração na reprodução das cópias desta tese.

ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Metodologia para a Determinação de Pró-vitaminas A... 5	
3.1.1. Método recomendado pela AOAC.....	12
3.1.2. Método recomendado pela COST91.....	16
3.1.3. Método recomendado pelo IVACG.....	18
3.1.4. Método recomendado por RODRIGUEZ-AMAYA <i>et</i> <i>alii</i> simplificado.....	19
3.1.5. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	21
3.1.6. Isômeros de pró-vitaminas A.....	25

3.2. Métodos Analíticos para a Determinação de carotenóides.....	36
3.2.1. Extração.....	37
3.2.2. Saponificação.....	39
3.2.3. Separação cromatográfica.....	41
3.2.3.1. Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CCA).....	42
3.2.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
3.2.4. Identificação e quantificação.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1. Amostragem e Preparo de Amostra.....	47
4.2. Cuidados Necessários.....	50
4.3. Métodos para a Determinação do Valor de Vitamina A...	52
4.4. Determinação dos Coeficientes de Absorção.....	57
4.5. Determinação dos Isômeros de Pró-vitaminas A.....	58
4.6. Confirmação da Presença de <i>Cis</i> -isômeros por CLAE.....	59
4.7. Cálculo do Valor de Vitamina A.....	60
4.8. Determinação Completa de Carotenóides.....	61
4.8.1. Triagem.....	61
4.8.2. Método por cromatografia em coluna aberta.....	62

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1. Desempenho de Três Métodos para a Determinação de Pró-vitaminas A.....	66
5.2. Coeficientes de Absorção ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de Alguns Carotenóides em Solventes Comuns.....	74
5.3. Ocorrência de Isômeros de Pró-vitaminas A.....	77
5.3.1. Em frutas.....	77
5.3.2. Em hortaliças.....	83
5.3.3. Confirmação da ocorrência de isômeros de pró- vitaminas A por CLAE.....	90
5.3.3.1. Em frutas.....	92
5.3.3.2. Em hortaliças.....	96
5.3.4. Comparação das porcentagens de isômeros do β -caroteno.....	101
5.4. Triagem da Composição de Carotenóides de Abricó, Buriti, Pequi, Nêspera, Nectarina e Pêssego	103
5.5. Composição de Carotenóides de Abricó (<i>Mammea americana</i> L.).....	106
5.6. Composição de Carotenóides de Buriti (<i>Mauritia vinifera</i>).....	115
5.7. Composição de Carotenóides de Pequi (<i>Caryocar villosium</i>).....	120
5.8. Composição de Carotenóides de Nêspera (<i>Eriobotrya japonica</i>).....	126
5.9. Composição de Carotenóides de Pêssego (<i>Prunus persica</i>).....	132

5.10. Composição de Carotenóides de Nectarina (<i>Prunus persica</i>).....	138
6. CONCLUSÕES.....	142
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1:	Valores de vitamina A de algumas frutas e hortaliças obtidos de Tabelas de Composição de Alimentos.....	6
TABELA 2:	Composição de carotenóides e valor de vitamina A de frutas e hortaliças.....	10
TABELA 3:	Classificação de frutas e hortaliças segundo a composição de carotenóides pró-vitamínicos.....	14
TABELA 4:	Bioatividade dos isômeros das principais pró-vitaminas A.....	28
TABELA 5:	Isômeros do β -caroteno reportados na literatura..	35
TABELA 6:	Amostragem de frutas para a determinação de <i>cis</i> -isômeros.....	49
TABELA 7:	Amostragem e condições do preparo doméstico de hortaliças para a determinação de <i>cis</i> -isômeros...	51
TABELA 8:	Teores de pró-vitamina A ($\mu\text{g/g}$) em tomate, couve e cenoura determinados por três métodos.....	67
TABELA 9:	Teores de pró-vitamina A de mamão obtidos com os diferentes procedimentos de saponificação, sugeridos pelo IVACG.....	69
TABELA 10:	Teores de pró-vitamina A ($\mu\text{g/g}$) determinados em mamão pelos três métodos.....	71
TABELA 11:	Coeficientes de absorção de alguns <i>trans</i> -carotenóides.....	75

TABELA 12: Valores da "razão Q" e máximos de absorção dos isômeros do β -caroteno.....	76
TABELA 13: Coeficientes de absorção dos isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina, e do β -apo-8'-carotenol.....	78
TABELA 14: Concentração de <i>cis</i> - e <i>trans</i> -isômeros de pró-vitaminas A em frutas.....	79
TABELA 15: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros em frutas.....	82
TABELA 16: Concentração de <i>cis</i> - e <i>trans</i> -isômeros de pró-vitaminas A em hortaliças "in natura".....	84
TABELA 17: Concentração de <i>cis</i> - e <i>trans</i> -isômeros de pró-vitaminas A em hortaliças cozidas.....	87
TABELA 18: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros em hortaliças "in natura".....	89
TABELA 19: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros em hortaliças cozidas.....	91
TABELA 20: Isômeros <i>cis-trans</i> do β -caroteno encontrados em frutas e hortaliças frescas e cozidas.....	102
TABELA 21: Resultado da triagem da composição de carotenóides.....	105
TABELA 22: Principais características dos carotenóides do abricó.....	107
TABELA 23: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de abricó.....	112
TABELA 24: Principais características dos carotenóides do buriti.....	116

TABELA 25: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de buriti.....	117
TABELA 26: Principais características dos carotenóides de pequi.....	121
TABELA 27: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de pequi.....	122
TABELA 28: Principais características dos carotenóides de nêspera.....	128
TABELA 29: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de nêspera.....	130
TABELA 30: Comparação da composição de carotenóides de nêsperas produzidas no Brasil, em Israel e no Japão.....	131
TABELA 31: Principais características dos carotenóides de pêssigo cultivar Diamante e de uma variedade chilena.....	134
TABELA 32: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de pêssigo cultivar Diamante e de uma variedade de pêssigo chileno.....	135
TABELA 33: Comparação dos teores de carotenóides de pêssigo.....	136
TABELA 34: Principais características dos carotenóides de nectarina.....	139
TABELA 35: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de nectarina.....	141

FIGURA 1:	Estrutura dos retinóis e de alguns carotenóides pró-vitamínicos.....	8
FIGURA 2:	Estrutura dos principais isômeros do β -caroteno..	26
FIGURA 3:	Esquema da metodologia recomendada por COST91....	53
FIGURA 4:	Esquema da metodologia recomendada pelo IVACG....	54
FIGURA 5:	Esquema da metodologia de RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificada.....	55
FIGURA 6:	Valores de equivalentes de retinol obtido pelos métodos de COST91, IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado.....	72
FIGURA 7:	Valores de equivalentes de retinol obtido pelos métodos de COST91-modificado, IVACG-modificado e RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado.....	73
FIGURA 8:	Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos totais de (A) mamão, (B) maracujá, (C) nectarina e (D) pêssego.....	93
FIGURA 9:	Cromatogramas obtidos por CLAE das frações pró- vitamínicas separadas pela coluna de MgO:hiflosu- percel: (A) fração de β -caroteno de pêssego, (B) fração de β -caroteno de mamão, (C) fração de β - criptoxantina de mamão e (D) Fração de β - criptoxantina de pêssego.....	94
FIGURA 10:	Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos totais de (A) cenoura e (B) abóbora, e das frações de β - caroteno, isoladas através de coluna de MgO:hiflo- supercel, de (C) tomate e (D) pimentão vermelho..	97
FIGURA 11:	Cromatogramas por CLAE das frações de β -caroteno obtidas a partir da coluna de MgO:hiflosupercel : (A) brócolis, (B) couve, (C) espinafre e (D) va- gem.....	98
FIGURA 12:	Cromatograma obtido por CLAE do extrato total de cenoura cultivar Nantes cozida.....	99

FIGURA 13: Cromatograma e espectros de absorção dos isômeros do β -caroteno de espinafre, obtidos utilizando o detector de arranjo de diodos.....	100
FIGURA 14: Aspecto das placas de sílica gel após desenvolvimento em 10% de éter etílico em éter de petróleo (a); 70% de éter etílico em éter de petróleo (b) e 5% de etanol em éter de petróleo (c).....	104
FIGURA 15: Espectro de massa do β -apo-8'-carotenol.....	109
FIGURA 16: Espectro de massa do produto de redução com NaBH_4 de um padrão sintético de β -apo-8'-carotenol....	110
FIGURA 17: Cromatogramas obtidos por CLAE: (A) frações de β -apo-8'-carotenol (1) e β -apo-10'-carotenal (2) do abricó; (B) frações de β -apo-8'-carotenol (1) e β -apo-10'-carotenal (2) do abricó e padrão sintético de β -apo-8'-carotenal (3); (C) fração de β -apo-8'-carotenol do abricó + produto de redução do padrão de β -apo-8'-carotenal (1) e β -apo-10'-carotenal (2) do abricó.....	114
FIGURA 18: Comparação dos valores de vitamina A entre algumas fontes ricas em pró-vitaminas A.....	119
FIGURA 19: Espectro de massa da fração de β -criptoxantina isolada do pequi.....	124
FIGURA 20: Espectro de massa da fração de zeaxantina isolada do pequi.....	125
FIGURA 21: Cromatograma obtido por CLAE do extrato total de pequi.....	127

ANEXO 1: Estrutura dos carotenóides presentes nas amostras analisadas.....	177
ANEXO 2: Espectro de absorção em éter de petróleo do β -caroteno e zeaxantina (—), 13- <i>cis</i> - β -caroteno (---) e 9- <i>cis</i> - β -caroteno (---).....	179
ANEXO 3: Espectro de absorção em éter de petróleo do α -caroteno (...), 13- <i>cis</i> - α -caroteno (—) e 9- <i>cis</i> - α -caroteno (---).....	180
ANEXO 4: Espectro de absorção em éter de petróleo da α -criptoxantina (—), γ -caroteno (---), ζ -caroteno (---) e β -zeacaroteno (...).	181
ANEXO 5: Espectro de absorção em éter de petróleo da β -criptoxantina (—), neo- β -criptoxantina (---) e 5,6-monocépoxi- β -criptoxantina (---).....	182
ANEXO 6: Espectro de absorção em éter de petróleo do β -apo-8'-carotenol (—) e do β -apo-10'-carotenal, antes (...) e depois (---) da reação de redução com NaBH_4	183
ANEXO 7: Espectro de absorção em éter de petróleo da violaxantina (—), luteoxantina (---), auroxantina (...) e neoxantina (---).....	184
ANEXO 8: Espectro de absorção em éter de petróleo do neurosporeno (—).....	185

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos com a finalidade de se obter procedimentos simples, rápidos e econômicos para a determinação de pró-vitamina A em alimentos. Neste trabalho foram avaliados três desses métodos, a saber: COST91, IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* simplificado. Os alimentos escolhidos foram couve, cenoura, mamão e tomate, devido as suas características distintas quanto à composição de pró-vitamina A. As principais deficiências apresentadas pelo método recomendado por COST91 foram a extração incompleta e a saponificação drástica. Outra grande falha do método foi a não separação entre α - e β -caroteno, e a não consideração da α - e β -criptoxantina e γ -caroteno. No método apresentado pelo IVACG, a extração foi insuficiente apenas para couve; demonstrou-se mais versátil que COST91, pois permitiu a separação das diferentes pró-vitaminas. Dos procedimentos de saponificação sugeridos pelo IVACG, a saponificação à frio confirmou ser a técnica mais aconselhável. O método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* simplificado mostrou-se o mais indicado, principalmente pela sua simplicidade e exatidão.

Independente do método cromatográfico empregado, os coeficientes de absorção são utilizados nos cálculos das concentrações dos carotenóides. Sendo assim, foram determinados os valores dos coeficientes de absorção, de algumas pró-vitaminas A e carotenóides, ainda inexistentes ou que apresentam uma discrepância nos dados da literatura.

Desde que os *cis*-isômeros possuem uma atividade vitamínica menor que a respectiva forma *trans* há uma preocupação sobre a necessidade da separação dos isômeros das pró-vitaminas A na determinação do real valor de vitamina A dos alimentos. Neste

trabalho 12 frutas, algumas de diferentes cultivares, e 11 hortaliças cruas e 7 cozidas, totalizando 198 amostras, foram analisadas em duplicata fornecendo uma visão mais ampla da ocorrência natural dos *cis*-isômeros das pró-vitaminas. A presença de isômeros foi confirmada por cromatografia de coluna aberta e por CLAE. As frutas puderam ser classificadas em dois grandes grupos: (1) aquelas que tinham o β -caroteno como principal pró-vitamina e, (2) aquelas nas quais a β -criptoxantina predominava. *Cis*-isômeros não foram encontrados em cajá, mamão Solo e Tailândia, maracujá, pitanga e acerola. Traços de 13-*cis*- β -caroteno foram encontrados em algumas amostras de nêspera e manga Tommy Atkins e Haden. Abriçó, buriti, nectarina, pêssego Diamante e uma variedade chilena e pequi apresentaram os isômeros 13-*cis* e 9-*cis* do β -caroteno. Nectarina, pêssego e pequi também tinham neo- β -criptoxantina (provavelmente 13-*cis*). Utilizando o procedimento de cálculo atualmente adotado em todo o mundo, o valor de vitamina A foi calculado com e sem a separação dos isômeros. Uma superestimação de apenas 3-10% de equivalentes de retinol ocorreu quando a separação de isômeros não fez parte da análise, indicando dessa forma que a separação de isômeros não é importante para as frutas frescas. Por outro lado, todas as hortaliças "in natura" analisadas, exceto tomate e cenoura, apresentaram *cis*-isômeros. O valor de vitamina A calculado sem e com a separação dos isômeros, mostrou uma superestimação de 10-22%, quando os isômeros não foram separados. Todas as hortaliças cozidas analisadas, inclusive cenoura, apresentaram isômeros de pró-vitaminas A, ficando a superestimação do valor vitamínico quando os isômeros não são separados entre 5-20%. Desta forma, a separação de isômeros é necessária para a maioria das hortaliças, tanto "in natura" como cozidas.

Devido a outras funções fisiológicas, observadas mais recentemente, a composição completa de carotenóides de algumas frutas brasileiras também foi determinada. O abriçó (*Mammea americana* L.) apresentou variações quantitativas maiores que aquelas normalmente encontradas em frutas. Violaxantina, β -

caroteno e β -apo-8'-carotenol alternavam como carotenóide principal. Além disso, sua composição revelou-se atípica, devido à concentração elevada de β -apo-10'-carotenal e a presença de um novo carotenóide, β -apo-8'-carotenol, também presente em concentrações apreciáveis. A estrutura desse carotenóide foi elucidada utilizando-se a espectrometria de massa (EM). O valor de vitamina A encontrado (483 RE/100g) foi alto devido a quantidades elevadas de β -caroteno e β -apo-10'-carotenal, que são pigmentos que possuem as maiores atividades vitamínicas (100%). Pela sua estrutura o β -apo-8'-carotenol foi considerado também uma pró-vitamina com atividade semelhante ao β -apo-8'-carotenal (72%).

No buriti (*Mauritia vinifera* Mart.) foram identificados oito carotenos (13-*cis*- α -caroteno, α -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, β -zeacaroteno e γ -caroteno) e apenas uma xantofila (zeaxantina). O α - e β -caroteno foram os pigmentos majoritários, com 80,1 e 359,8 μ g/g, respectivamente (16 e 70% dos carotenóides totais). Devido à grande quantidade, especialmente de β -caroteno, o valor médio de vitamina A encontrado foi de 6489 RE/100g, o que torna o buriti uma das maiores fontes de pró-vitamina A.

O pequi é comumente citado como uma fonte rica em pró-vitamina A, entretanto a espécie *Caryocar villosium* acusou um valor médio relativamente baixo, 65 RE/100g. Isto porque o principal pigmento, a zeaxantina (56% do total de carotenóides) é inativa, e a β -criptoxantina (31% do total de carotenóides) possui apenas 50% de atividade. Os outros pigmentos identificados, em pequenas quantidades, foram o α -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno e neo- β -criptoxantina.

Em nêspera foram encontrados: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -criptoxantina, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, violaxantina, auroxantina e neoxantina. β -Caroteno e β -criptoxantina foram os principais pigmentos representando 45% e 27%, respectivamente, de um total

de carotenóides de 17,7 $\mu\text{g/g}$ e os que mais contribuíram para o valor de vitamina A de 179 RE/100g.

Os carotenóides identificados no pêssego cultivar Diamante foram: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, violaxantina, auroxantina e luteoxantina. Os primeiros sete carotenóides foram também encontrados na variedade chilena, além de luteína e zeaxantina. A β -criptoxantina foi o pigmento majoritário nos dois casos, representando 75% no pêssego Diamante e 43% na variedade chilena. O valor médio de vitamina A encontrado foi de 55 RE/100g e 73 RE/100g para o cultivar Diamante e para a variedade chilena, respectivamente.

Os frutos da nectarina apresentaram a seguinte composição: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina, mutatoxantina e auroxantina. O pigmento predominante foi a β -criptoxantina, representando 41% do conteúdo total de carotenóides (9,6 $\mu\text{g/g}$). Devido a pequena quantidade de pigmentos, o valor de vitamina A encontrado foi de apenas 54 RE/100g.

SUMMARY

Many analytical methods have been developed with the purpose of establishing a simple, rapid and economic procedure for determining the provitamins A in foods. In the present study, three methods were assessed: those of COST91, IVACG and RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* simplified. Kale, carrot, papaya and tomato were chosen as food samples because of their distinct characteristics in terms of the provitamin A composition. Incomplete extraction and drastic saponification were the principal deficiencies of the COST91 method. In addition, α - and β -carotene eluted together and β -cryptoxanthin and γ -carotene were not considered. For the IVACG method, the extraction was insufficient only for kale; it was more versatile than that of COST91, since the different provitamins were separated. Of the different saponification procedures, cold saponification was confirmed to be the best technique. The RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* simplified method proved to be the method of choice, principally for its simplicity and accuracy.

Irrespective of the chromatographic process utilized, the absorption coefficients are used for the calculation of the concentrations carotenoids. Thus, coefficients hitherto unestablished, or are discrepant in current literature, were determined..

Since the *cis*-isomers have lower biological potency than the corresponding *trans*-carotenoids, concern has been raised over the necessity of separating the isomers of provitamins A so as to determine the vitamin A value of foods more accurately. In this paper 12 fruits, some of different cultivars, 11 fresh vegetables and 7 cooked vegetables, totalling 198 samples, were analyzed in duplicate, to get an idea of the

natural occurrence of *cis*-isomers of provitamins A. The presence of isomers was confirmed by open column chromatography and HPLC. The different fruits can be divided into two main groups: (1) those having β -carotene as the principal provitamin, and (2) those with β -cryptoxanthin as the major provitamin. *Cis*-isomers of provitamins A were not found in "cajá", papaya cultivars Solo and Tailândia, passionfruit, "pitanga" and West Indian cherry. Traces of 13-*cis*- β -carotene were observed in some samples of loquat and mango cultivars Tommy Atkins and Haden. 13-*Cis*- and 9-*cis*- β -carotene were found at low levels in mamey, "buriti", nectarine, peach cultivar Diamante and Chilean peach and "pequi". Nectarine, peach and "pequi" had neo- β -cryptoxanthin, probably 13-*cis*. Utilizing the currently employed calculation procedure, the vitamin A values of the fruits were calculated, with and without isomer separation. Overestimations of only 3-10% of the retinol equivalents occurred when the isomers were not individually quantified, indicating that isomer separation is not necessary in the provitamin A determination of fresh fruits. On the other hand, the fresh vegetables, except tomato and carrot, had *cis*-isomers. Overestimations of 10-22% were obtained when individual quantification of isomers was not accomplished. All cooked vegetables analyzed, including carrot, had isomers of provitamins A, the overestimation being 5-20% when the isomers were not separated. Thus, isomer separation appears to be necessary for most vegetables, fresh or cooked.

Considering the other physiological functions, the complete carotenoid composition of some Brazilian fruits was determined. Mamey (*Mammea americana* L.) showed quantitative variation greater than normally found in fruits. Violaxanthin, β -carotene and β -apo-8'-carotenol alternated as principal pigment. Moreover, for two reasons, the composition was atypical: the presence of β -apo-10'-carotenol, especially at high levels, and of a new carotenoid, β -apo-8'-carotenol, also present in appreciable amounts. Mass spectrometry unequivocally proved the structure. The vitamin A value (483 RE/100g) was high because of

substantial amounts of β -carotene and β -apo-10'-carotenal, the pigments with the highest vitamin A activity (100%). With its structure, the β -apo-8'-carotenol was considered a vitamin A precursor with activity similar to β -apo-8'-carotenal (72%).

In "buriti" (*Mauritia vinifera* Mart.) eight carotenes (13-*cis*- α -carotene, α -carotene, 13-*cis*- β -carotene, β -carotene, 9-*cis*- β -carotene, ζ -carotene, β -zeacarotene and γ -carotene) and only one xanthophyll (zeaxanthin) were identified. α - and β -carotene were the principal pigments, with 80.1 and 359.8 $\mu\text{g/g}$, respectively (16 and 70% of total carotenoid content). The vitamin A value, 6489 RE/100g, was high because of the high amounts of β -carotene, making "buriti" one of the richest sources of provitamin A.

"Pequi" is usually cited as a rich source of provitamin A. The *Caryocar villosium* species, however, presented a low vitamin A value, 65 RE/100g. This is because the major pigment zeaxanthin (56% of the total carotenoid content) is inactive, and β -cryptoxanthin (31% of the total carotenoid) has only 50% activity. The other pigments identified, in small amounts, were: α -carotene, 13-*cis*- β -carotene, β -carotene, ζ -carotene and neocryptoxanthin.

13-*Cis*- β -carotene, β -carotene, ζ -carotene, neurosporene, β -cryptoxanthin, 5,6-mono-epoxy- β -cryptoxanthin, violaxanthin, auroxanthin and neoxanthin were found in loquat. β -Carotene and β -cryptoxanthin were the principal pigments, representing 45% and 27%, respectively, of a total carotenoid content of 17.7 $\mu\text{g/g}$. Both were the major contributors to the vitamin A value of 179 RE/100g.

The carotenoids encountered in peach cultivar Diamante were: 13-*cis*- β -carotene, β -carotene, 9-*cis*- β -carotene, ζ -carotene, neocryptoxanthin, β -cryptoxanthin, violaxanthin, auroxanthin and luteoxanthin. The first seven carotenoids were also found in the Chilean variety, besides lutein and zeaxanthin. In both varieties, β -cryptoxanthin was the principal

pigment, being responsible for 75% of the total carotenoid in Diamante and 43% in the Chilean peach. The mean vitamin A value was 55 RE/100g and 73 RE/100g for the Diamante and Chilean fruit, respectively.

13-*Cis*- β -carotene, β -carotene, 9-*cis*- β -carotene, ζ -carotene, neocryptoxanthin, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, mutatoxanthin and auroxanthin were identified in nectarine. β -Cryptoxanthin was the major pigment, accounting for 41% of the total carotenoid content (9.6 μ g/g). Considering the low pigment level, the vitamin A value was low, 54 RE/100g.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides tem sido objeto de investigações por mais de um século. Mesmo assim, existem ainda pontos de discordância e falta de informações em outros. Portanto, aproveitando a riqueza natural brasileira em carotenóides, o presente trabalho pretende preencher algumas dessas lacunas.

Há muito tempo temos assistido discussões sobre a importância da vitamina A e as linhas de ação que podem ser tomadas para combater a sua deficiência. Entretanto, a hipovitaminose A ainda persiste como um problema nutricional sério nos países em desenvolvimento. Devido ao alto custo de alimentos de origem animal, uma grande parte da vitamina A fornecida pela dieta encontra-se na forma de pró-vitamina A, proveniente dos alimentos de origem vegetal, como frutas, hortaliças e legumes.

Muitos esforços tem sido feitos visando a determinação correta dos valores de vitamina A nos alimentos, considerando-se que esta análise não é uma tarefa fácil. Existe um grande número de carotenóides na natureza e os alimentos variam consideravelmente na sua composição quali e quantitativa. Além disso, nem todos os carotenóides possuem atividade pró-vitamínica A e aqueles que são ativos apresentam atividades diferentes.

Vários procedimentos analíticos, incluindo as técnicas mais modernas, tem sido empregados para a determinação de pró-vitaminas A. Sabendo-se, no entanto, que essas técnicas avançadas são muito onerosas, alguns métodos foram desenvolvidos a fim de se obter técnicas mais simples, rápidas e mais econômicas, sem prejuízo da confiabilidade dos resultados.

No Brasil, o método desenvolvido por RODRIGUEZ et alii (1976a) tem sido usado para a determinação da composição completa de carotenóides e com base nas concentrações das pró-vitaminas e utilizando as respectivas atividades, os valores de vitamina A são também calculados. Para determinar somente as pró-vitaminas, pode ser utilizada uma versão simplificada do método. O referido procedimento simplificado já foi comparado e demonstrado ser superior ao método oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (RODRIGUEZ-AMAYA et alii, 1988), bem como comparável com métodos que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (CARVALHO et alii, 1992). Uma das vantagens do método descrito é que o mesmo permite ajustes de acordo com a natureza da amostra, mas a principal é que todas as pró-vitaminas podem ser determinadas separadamente, permitindo a obtenção de valores mais exatos de vitamina A.

Neste trabalho foram avaliados os métodos de COST91 (BRUBACHER et alii, 1985) e IVACG (1987) em comparação ao método de RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado. A COST (Cooperation Europeenne dans le domaine de la recherche Scientifique et Technique) e o IVACG (International Vitamin A Consultative Group) são entidades de renome internacional que também reconheceram a necessidade de métodos mais adequados com vistas à obtenção de resultados mais consistentes.

Na natureza os carotenóides se apresentam normalmente na sua forma mais estável que é a configuração *trans*, embora algumas formas *cis* possam ocorrer naturalmente. Desde que os isômeros possuem atividade vitamínica menor que as respectivas formas *trans*, aumenta a preocupação quanto à necessidade da separação e quantificação individual dos isômeros das pró-vitaminas A para uma determinação mais exata do valor vitamínico dos alimentos. Esta operação, entretanto, não é fácil de ser realizada. Utilizando cromatografia de coluna aberta, é necessária uma recromatografia das frações isoladas das pró-vitaminas em colunas de MgO:hiflosuperpel em colunas de Ca(OH)₂ e, especialmente no caso da segunda coluna, a eficiência e

reprodutibilidade da separação dependem consideravelmente da experiência e habilidade do analista.

Mesmo com o grande potencial e poder de resolução que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta, as condições de análise ainda não estão bem estabelecidas. Somente duas colunas parecem ser eficientes na separação dos isômeros do α - e β -caroteno: Vydac 201 TP C18 e Ca(OH)_2 , embora esta última tenha que ser empacotada no laboratório. A separação dos isômeros das outras pró-vitaminas por CLAE ainda não foi reportada. Mesmo com uma boa separação dos isômeros das pró-vitaminas, a determinação da concentração absoluta é problemática, pois devido à susceptibilidade dos carotenóides à isomerização e oxidação, é difícil manter os padrões estáveis e a obtenção de padrões de *cis*-isômeros é extremamente difícil.

Outros problemas, como a formação de *cis*-isômeros durante a análise e o desconhecimento dos valores dos coeficientes de absorção desses isômeros, já que a concentração é calculada espectrofotometricamente, fazem com que antes da introdução de uma etapa de separação das formas isoméricas num método oficial de análise, se deva ter uma visão mais ampla da ocorrência natural de *cis*-isômeros de pró-vitaminas.

Com sua grande extensão territorial, sujeita a diferentes condições climáticas, o Brasil possui uma grande variedade de frutas e hortaliças, o que proporciona condições ideais para um estudo da ocorrência de isômeros de pró-vitaminas A.

Além das já conhecidas, outras funções tem sido também atribuídas aos carotenóides, sendo a mais destacada sua possível ação inibidora de certos tipos de câncer (MATHEUS-ROTH, 1985; COLDITZ et alii, 1985; BENDICK, 1989a,b; ZIEGLER, 1989; KRINSKY, 1989). Como tais funções não são restritas somente às pró-vitaminas, a abordagem ideal envolveria determinação da composição completa desses pigmentos, porém a análise torna-se neste caso mais complexa e demorada.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são:

(1) Avaliar e comparar métodos de determinação de carotenóides pró-vitamínicos, para países em desenvolvimento.

(2) Verificar a incidência de *cis* isômeros em frutas e hortaliças nacionais, a fim de avaliar a real necessidade da separação dessas formas isoméricas para um cálculo mais exato do valor de vitamina A.

(3) Determinar a composição completa de carotenóides de frutas nacionais, principalmente de algumas frutas nativas e outras ainda não estudadas, ou com poucos dados a respeito da composição de carotenóides.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metodologia para a Determinação de Pró-vitaminas A

A atividade pró-vitamínica A é uma das principais funções desempenhadas pelos carotenóides. Principalmente em países em desenvolvimento a deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública, pois devido ao alto custo de alimentos de origem animal, que são fontes de vitamina A (retinol, ácido retinóico, éster de retinila, retinal, 3-desidrorretinol), grande parte da população é impossibilitada de consumir esse tipo de alimento. Neste caso, os carotenóides podem chegar a contribuir com mais de 80% das necessidades de vitamina A (SIMPSON, 1983). Em países desenvolvidos, a contribuição das pró-vitaminas, embora menor, ainda é significativa, chegando a 50% nos EUA e 30-50% na Inglaterra (WITSCHI *et alii*, 1970; THOMPSON, 1965).

Infelizmente, os resultados encontrados na literatura sobre o conteúdo de carotenóides pró-vitamínicos, e, conseqüentemente, o valor de vitamina A necessitam ser reavaliados, principalmente devido às dificuldades analíticas inerentes (ZACARIA *et alii*, 1979; BEECHER & KHACHIK, 1984; UNDERWOOD, 1984; BUREAU & BUSHWAY, 1986; RODRIGUEZ-AMAYA, 1985, 1989) Tais dados são muito importantes na reformulação das tabelas de composição de alimentos (TABELA 1) onde muitos dos teores apresentados são discrepantes. Essas tabelas são ferramentas indispensáveis para profissionais, principalmente da área de saúde, tentarem minimizar ou solucionar o problema da hipovitaminose A.

TABELA 1: Valores de vitamina A de algumas frutas e hortaliças, obtidos de Tabelas de Composição de Alimentos.

alimento	valor de vitamina A (UI)							
	Taiwan	Japão	Filipinas	USA	FAO	INCAP	Brasil a b	
cenoura	13000	4100	18500	11000	11667	11767	11000	11000
nespera	900	400	-	670	1291	433	430	-
manga	2100	-	2580-4225	4800	3130	2100	-	2200
mamão	1560	47	425	1750	1180	367	370	-
pimentão								
verde	4000	160	260	420	2917	1567	245	2000
vermelho	6500	1100	1785	21600	11000	1567	-	6500
pessego	tr	-	-	1330	410	17	400	3750
abóbora	900	340	-	1600	1308	3066	3500	2800
caqui	1800	65	2500	2710	1000	2500	-	2500

referência: TSOU et alii (1984)

INCAP-ICNND - LEUNG & FLORES (1961)

a Tabela de Composição de Alimentos - IBGE - ENDEF (1985)

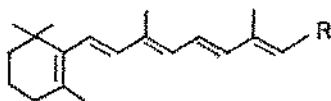
b Tabela de Composição Química dos Alimentos - FRANCO (1992)

Cerca de 800 carotenóides já foram isolados e mais de 600 tem suas estruturas elucidadas. No entanto, os carotenóides que ocorrem em alimentos não atingem nem a metade desse número, e aqueles que podem ser convertidos em vitamina A no organismo são mais ou menos 50 (BAUERNFEIND *et alii*, 1972; GOODWIN & BRITTON, 1988) (FIGURA 1). Para atuar como precursor de vitamina A, o carotenóide deve apresentar pelo menos um anel β -ionona não substituído, ligado a uma cadeia lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos. Isso deixa bem claro que nem todos os carotenóides tem atividade vitamínica. É evidente, também, que não há necessidade em se determinar a composição completa de carotenóides para se avaliar o teor de vitamina A, basta apenas separar e quantificar os pró-vitamínicos.

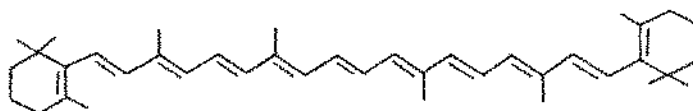
Existem vários fatores que dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre o teor de pró-vitamina A. Devido à própria natureza dos carotenóides, muitos cuidados devem ser tomados durante a análise, especialmente com relação à exposição ao oxigênio, luz, calor e ácidos que promovem além da perda dos carotenóides, a formação de artefatos. A esses cuidados inclui-se o uso de solventes livres de impurezas (peróxidos, ácidos, etc), tempo de análise o menor possível, aplicação de atmosfera inerte e o uso de antioxidantes. Além disso, as amostras de alimentos podem variar amplamente tanto na composição quali como quantitativa. Todos esses fatores dificultam em se estabelecer um método geral para a determinação do valor vitamínico A. EITENMILLER (1989) numa revisão sobre desenvolvimento das metodologias para a determinação de vitaminas, classificou os métodos para carotenos como conflitantes.

Independente do método utilizado para a determinação de carotenóides pró-vitamínicos, este deve apresentar alguns requisitos indispensáveis para a obtenção de dados confiáveis, como: (1) separação individual dos carotenóides ativos e de suas respectivas formas isoméricas; (2) eliminação dos carotenóides inativos, evitando dessa forma a superestimação do valor vitamínico; (3) medidas para evitar perdas e formação de

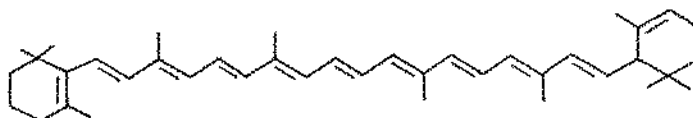
R = CH₂OH retinol
 CHO retinal
 COOH ác. retinóico



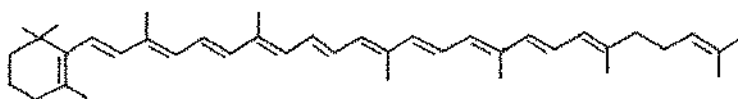
β -caroteno



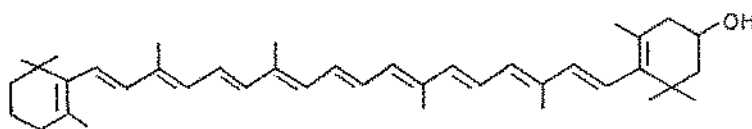
α -caroteno



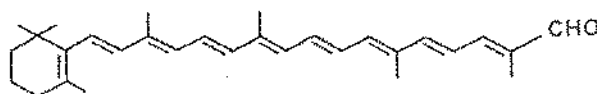
δ -caroteno



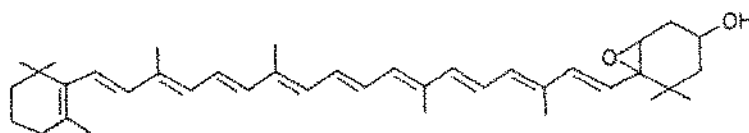
β -criptoxantina



β -apo-8'-carotenal



5,6-monoepoxi- β -criptoxantina



β -zeacaroteno

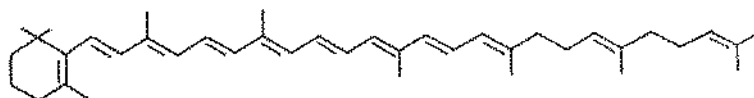


FIGURA 1: Estrutura dos retinois e de alguns carotenóides pró-vitamínicos.

artefatos durante a análise; e (4) adequação do método à natureza da amostra a ser analisada (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). À medida que essas exigências são cumpridas, é claro que a execução do método se torna cada vez mais difícil, porém pequenas simplificações podem ser introduzidas, desde que não prejudiquem o resultado final.

Os primeiros procedimentos para a determinação do valor de pró-vitamina A baseavam-se no conteúdo total de carotenóides, calculado através da absorção no comprimento de onda máximo do β -caroteno. A falha do método é imediatamente sentida à medida que a TABELA 2 é considerada. Em muitos alimentos há um grande número de carotenóides e por vezes o principal carotenóide não é ativo, como no caso de tomate, goiaba e mamão.

Posteriormente, o valor de vitamina A passou a ser calculado baseando-se na chamada "fração de β -caroteno" ou "caroteno total". O método recomendado pela AOAC (DEUTSCH, 1990) e o recomendado pela COST91 baseam-se exatamente nessa abordagem. Essa aproximação é apropriada se for considerado que o β -caroteno é o carotenóide mais amplamente distribuído na natureza e é o que possui a maior atividade pró-vitamínica. No entanto, em alguns alimentos, nessa fração existem quantidades significativas de carotenóides com atividades pró-vitamínicas menores, como também carotenóides inativos, resultando na superestimação do valor de vitamina A. Por outro lado, podem existir carotenóides ativos que não estão incluídos nessa fração, assim subestimando significativamente o valor de vitamina A, como por exemplo em caju, mamão e abóbora (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Métodos para uma determinação mais exata do valor de vitamina A foram desenvolvidos, baseando-se na separação e quantificação individual de todas as pró-vitaminas, considerando-se a atividade de cada uma delas. São os métodos recomendados pelo IVACG (1987) e por RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988), baseado no método de RODRIGUEZ *et alii* (1976a) para a composição completa de carotenóides.

TABELA 2: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de frutas e hortaliças.

alimento	total carot. (µg/g)	carot. pró-vitamínico (% contribuição para o valor de vitamina A)	outros carot.	carot. principal	valor vit RE/100g
Abóbora cv"Menina Verde"	79,6	α-caroteno (22%) β-caroteno (76%) mutatocromo (-) α-criptoxantina (1%) β-caroteno (-)	2,5,6,7, 10,11,12, 21,22	β-caroteno	862,4
cv"Baianinha"	317,8	α-caroteno (9%) β-caroteno (91%) α-criptoxantina (-) 5,6-epoxi-β-caroteno(-) mutatocromo (-)	3,5,6,7, 10,12,13, 15,18,22, 23,25	β-caroteno	4317,5
cv"Tetsukaboto"	52,3	α-caroteno (1%) β-caroteno (73%) β-criptoxantina (26%) mutatocromo (-) cis-β-caroteno (-)	5,10,11, 12,14,17, 18,22,23, 24,25	luteína β-caroteno	295,6
cv"Exposição"	46,0	α-caroteno (-) β-caroteno (96%) α-criptoxantina (3%) β-criptoxantina (-) mutatocromo (-) criptoflavina (-)	7,10,11, 13,17,21, 23,24	luteína β-caroteno	287,5
Cajá	25,8	α-caroteno (9%) β-caroteno (14%) β-criptoxantina (74%) criptoflavina (8%)	6,10,25	luteína β-caroteno β-criptoxantina	186,7
Goiaba cv"IAC-4"	62,1	β-caroteno (10%) γ-caroteno (-)	6,8,19, 20,25	licopeno	61,7
Mamão cv"comum"	11,0	β-caroteno (18%) β-zeacaroteno (1%) 5,6-epóxi-β-criptoxantina(15%) β-criptoxantina (60%) criptoflavina (6%)	6	β-cripto- xantina	111,7
cv"Formosa"	40,6	β-caroteno (43%) 5,6-epoxi-β-cripto- xantina (15%) β-criptoxantina (41%)	1,6,8	licopeno	143,3
cv"Solo"	34,8	β-caroteno (34%) γ-caroteno (1%) 5,6-epoxi-β-cripto- xantina (-) β-criptoxantina (65%)	6,8	licopeno	124,2

cv"Tailândia"	60,1	β -caroteno (28%) 5,6-epoxi- β -criptoxantina (15%) β -criptoxantina (59%)	1,6,8	licopeno	136,6
Manga cv"Bourbon"	14,3	β -caroteno (97%) mutatocromo (-) α -criptoxantina (3%)	3,6,12, 16	β -caroteno luteoxantina	138,2
cv"Extrema"	30,5	β -caroteno (99%) mutatocromo (-) α -criptoxantina (1%)	3,12,16, 21	β -caroteno	430,5
cv"Haden"	13,9	β -caroteno (96%) mutatocromo (-) α -criptoxantina (4%)	3,6,12, 16,21	β -caroteno luteoxantina	115,3
cv"Ouro"	24,0	β -caroteno (98%) mutatocromo (-) α -criptoxantina	3,6,12, 16,21	β -caroteno	307,3
cv"Tommy Atkins"	19,2	β -caroteno (98%) α -criptoxantina (2%)	3,6,12, 16,21	β -caroteno	223,7
Cajú cv"Amarelo"	1,4	α -caroteno (-) β -caroteno (65%) β -criptoxantina(30%)	2,3,4,6	β -caroteno β -criptoxantina	14,0
cv"Vermelho"	3,4	α -caroteno (-) β -caroteno (75%) β -criptoxantina (25%)	2,3,4,6	β -caroteno β -criptoxantina	37,6
Tomate cv"Santa Cruz"	41,4	β -caroteno (93%) γ -caroteno (7%)	6,8,9	licopeno	90,8
Hortaliças folhosas (16 diferentes)	1,0-109,8	β -caroteno (100%) β -criptoxantina (-)	10,21,24	luteína β -caroteno β -criptoxantina	16,7 a 1838,1

referência: RODRIGUEZ-AMAYA (1989)

(-) contribuição desprezível

(1) anteraxantina; (2) aurocromo; (3) auroxantina; (4) criptocromo; (5) β -zeacaroteno; (6) ζ -caroteno; (7) cis- β -caroteno; (8) licopeno; (9) cis-licopeno; (10) luteína; (11) cis-luteína; (12) luteoxantina; (13) cis-luteoxantina; (14) flavoxantina; (15) cis-flavoxantina; (16) mutatoxantina; (17) neoxantina; (18) neurosporeno; (19) 5,6,5',6'-diepoxi- β -caroteno; (20) 5,8-epoxi- β -caroteno; (21) violaxantina; (22) cis-violaxantina; (23) taraxantina; (24) zeaxantina; (25) zeinoxantina.

Mais recente são os métodos desenvolvidos com a utilização da CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), no entanto, ainda não há nenhum método estabelecido capaz de separar todos os carotenóides pró-vitamínicos e suas diversas formas isoméricas (REEDER & PARK, 1975; ZACARIA, 1979; STANCHER & ZONTA, 1982; BUSHWAY & WILSON, 1982; BUSHWAY, 1986; SPEEK *et alii*, 1986; QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986; EDWARDS & LEE, 1986; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; QUACKENBUSH, 1987; KHACHIK & BEECHER, 1985; LESELLIER *et alii*, 1989; PETERSSON & JONSSON, 1990; O'NEIL *et alii*, 1991; PHILIP & CHEN, 1988b; HEINONEM, 1990).

3.1.1. Método recomendado pela AOAC

Foi um dos métodos mais utilizados para a determinação de pró-vitamina A em alimentos (método 941.15 da AOAC) (DEUTSCH, 1990). Basicamente o método consiste na extração com acetona e hexano, filtração, lavagem com água e ajuste do extrato a um volume conhecido. A solução é aplicada em uma coluna cromatográfica de MgO (ativado):hiflosupercel (1:1). Os carotenos são eluídos com acetona/hexano (4:96), a absorbância lida a 436 nm e o resultado é expresso em UI (unidades internacionais) ou mg de β -caroteno. Os dados para carotenos e valor de vitamina A encontrados nas tabelas de composição de alimentos foram obtidos a partir desse método.

Devido a sua simplicidade, aparentemente é um método vantajoso. No entanto, tem sido muito criticado, citado muitas vezes como um método inadequado para a determinação de pró-vitamina A (REEDER & PARK, 1975; SIMPSON & CHICHESTER, 1981; CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1981a; RODRIGUEZ-AMAYA, 1985; SIMPSON

et alii 1985; SIMPSON & TSOU, 1986; QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986; RODRIGUEZ-AMAYA *et alii*, 1988; TEE & LIM, 1991a,b).

GEBHARDT *et alii* (1977), trabalhando com pêssego, compararam o método da AOAC e um proposto pelos autores, envolvendo separação em coluna aberta empacotada com MgO:hiflosupercel (1:3) e Mg(OH)₂:Ca(OH)₂ (1:6), utilizando concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo. O valor de vitamina A foi de 2983 UI/100g pelo método da AOAC e de apenas 535 UI/100g pelo método proposto. Os autores observaram que na fração de caroteno da AOAC, além do β-caroteno, haviam β-criptoxantina e outros carotenóides poli-hidroxilados, o que explicava o alto valor de vitamina A encontrado.

Em 1979, ZAKARIA *et alii* encontraram por CLAE um valor de vitamina A de tomate, considerando apenas o β-caroteno, e assumiram que este valor era 15 vezes menor do que seria o obtido pelo método da AOAC. Os autores não realizaram a determinação de acordo com a AOAC e basearam a superestimação no conteúdo de licopeno, que, na realidade, não é quantificado pelo método da AOAC.

BUSHWAY & WILSON (1982) compararam os valores de vitamina A obtidos pelo método da AOAC e um método utilizando CLAE, que quantificava apenas α- e β-caroteno. Os resultados obtidos pelo método da AOAC foram sempre superiores, e a justificativa dada pelos autores é que na técnica utilizando coluna aberta, carotenóides sem atividade ou com atividade menor que a do β-caroteno eram eluídos da coluna e quantificados como β-caroteno.

SIMPSON *et alii* (1985) comparando os resultados encontrados pelo método da AOAC e métodos por CLAE, observaram que para algumas frutas e hortaliças tinha-se resultados semelhantes, enquanto que para outros ocorria uma superestimação do valor vitamínico. Tomando como base os dados da pesquisa, SIMPSON & TSOU (1986) classificaram as frutas e hortaliças em três grupos (TABELA 3). No grupo (1) estariam aqueles onde o

TABELA 3: Classificação de frutas e hortaliças segundo a composição de carotenóides pró-vitamínicos.

grupo	alimentos
1	couve, alface, espinafre, repolho, pimentão verde, tomate, coentro, batata-doce, aipo, melão, marmelo
2	cenoura, abóbora
3	manga, mamão, laranja, pessego, carambola, pimenta

referência: SIMPSON & TSOU (1986)

método da AOAC poderia ser aplicado sem qualquer modificação; no grupo (2) aqueles que necessitam de gradiente durante a cromatografia, para possibilitar a separação dos diferentes carotenóides pró-vitamínicos; e no grupo (3) aqueles que precisam, além do gradiente, uma etapa de saponificação

RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) determinaram a composição da fração obtida pelo método da AOAC de vários alimentos e constataram a presença de pró-vitaminas menos ativas, como α -caroteno, β -zeacaroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina e γ -caroteno, assim como carotenóides inativos, como β -caroteno e zeinoxantina, que eluem juntamente com o β -caroteno. Outra falha do método é o uso de uma quantidade fixa de solvente para a extração, não levando em conta a natureza da amostra, o que pode ocasionar uma extração incompleta dos pigmentos. Além disso, a leitura da solução é feita a 436 nm, que não representa o comprimento de absorção máxima do β -caroteno. Segundo os resultados obtidos por RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988), o método da AOAC apresentou resultados comparáveis para couve e tomate, quando comparado com o método proposto pelos autores, no entanto foi três vezes maior em abóbora, e dobrou com relação ao mamão.

TEE & LIM (1991b) chegaram às mesmas conclusões feitas por RODRIGUEZ-AMAYA (1989) e SIMPSON *et alii* (1985) quando compararam os dados encontrados pelo método da AOAC e um método desenvolvido por eles, utilizando CLAE, em 40 hortaliças e 14 frutas da Malásia. Dependendo da composição de carotenóides, o método da AOAC sub ou superestimava o valor vitamínico dos alimentos.

3.1.2. Método recomendado pela COST91

A COST91 é uma organização inaugurada com a participação de cientistas europeus que sentiram a necessidade de melhores métodos padronizados, em virtude da falta de dados confiáveis em relação ao valor nutricional, à distribuição e ao efeito do processamento sobre as vitaminas nos alimentos. COST91 (BRUBACHER *et alii*, 1985) descreve três procedimentos diferentes que dependem do material a ser analisado:

Procedimento A: Determinação do total de carotenos em alimentos prontos para o consumo.

Procedimento B: Determinação do total de carotenos em frutas, hortaliças e materiais de origem vegetal inalterados.

Procedimento C: Determinação do total de carotenos em bebidas, sucos de frutas e preparações à base de frutas.

Nos três procedimentos os carotenos são recolhidos em uma única fração e calculados como β -caroteno. Carotenos homólogos e isômeros não são separados, já que segundo os autores as quantidades de α -caroteno e isômeros presentes nos alimentos são muito pequenas, tornando a separação desnecessária.

No procedimento A, a amostra é saponificada com hidróxido de potássio 50% em etanol, éter de petróleo (30^o-60^oC) e hidroquinona, deixando a mistura em banho-maria por 30 minutos, com agitação, a uma temperatura de aproximadamente 60^oC sob refluxo de nitrogênio. Os pigmentos são extraídos com éter etílico com adição de água e agitação. Após separação das fases, uma alíquota é retirada e lavada com éter saturado com água, para

a remoção do álcali, evaporada em evaporador rotatório e submetida à cromatografia.

No procedimento B para amostras secas (abaixo de 15% de umidade), de 1,5 a 3,0 g são deixadas em uma mistura de hexano ou éter de petróleo e acetona (70:30) por uma noite, sob atmosfera de nitrogênio. A saponificação é feita com solução metanólica de KOH 40% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após adição de água e separação das fases, a porção orgânica é colocada a volume e uma alíquota é tomada e evaporada em evaporador rotatório, seguindo-se então a cromatografia.

Para amostras frescas, como frutas e hortaliças, 10 g são tomadas e extraídas com três porções de 50 mL de acetona. O extrato combinado é colocado a volume e uma alíquota é então saponificada da mesma forma como descrito anteriormente para amostras secas. Após adição de hexano ou éter de petróleo, a mistura é lavada com água, para a remoção do álcali e da acetona, e evaporada.

No procedimento C, cerca de 50 mL (ou gramas) da amostra é agitada com 200-400 mL de clorofórmio por 30 minutos. A emulsão formada é então centrifugada e a fase aquosa desprezada. O extrato clorofórmico é filtrado e uma alíquota é concentrada para a cromatografia.

Nos três procedimentos, a água residual é removida pela adição de etanol e após evaporação, o resíduo é dissolvido em hexano e novamente evaporado para a remoção de traços de etanol. O resíduo é finalmente dissolvido em hexano ou éter de petróleo e aplicado em coluna cromatográfica, empacotada com Al_2O_3 desativada. A fração de carotenos é eluída, sem o auxílio de vácuo, com hexano ou éter de petróleo. As xantofilas devem permanecer no topo da coluna.

A quantificação é feita utilizando-se o valor da absorbância a 450 nm e o valor de 2590 e 2600 para o coeficiente de absorção em hexano ou éter de petróleo, respectivamente.

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989) e RODRIGUEZ-AMAYA & FARFAN (1991), existem no método etapas que podem ser simplificadas, eliminando a possibilidade de degradação pelo excessivo manuseio da amostra. Em amostras onde a quantidade de β -caroteno é significativa, como por exemplo em abóbora e cenoura, pode ocorrer uma superestimação do valor de vitamina A. Por outro lado, em amostras que apresentam a β -criptoxantina como principal pigmento, como no caso do mamão, o valor vitamínico é subestimado.

Por ser um método recente, não existe ainda na literatura trabalhos de avaliação do mesmo.

3.1.3. Método recomendado pelo IVACG

Entre as propostas do IVACG, além da preparação de relatórios mostrando a distribuição e magnitude da hipovitaminose A, está a dos métodos analíticos para uma determinação mais exata dos teores de vitamina A em alimentos.

O método recomendado pelo grupo inicialmente se preocupa com a inativação das enzimas por branqueamento. A extração é feita com acetona em liquidificador, e o homogeneizado transferido para um funil de vidro sinterizado. Sucessivas porções de acetona são adicionadas para completar a extração. O extrato é transferido para um funil de separação com água e hexano, agitando vagarosamente e deixando em repouso até separação das fases. A fase de acetona e água é colocada num segundo funil de separação e re-extraída com porções de hexano, duas ou três vezes. Os extratos de hexano são combinados, lavados com água, para a retirada da acetona, e concentrado em evaporador

rotatório. Neste ponto o extrato pode ser cromatografado ou ir para a saponificação.

A saponificação é feita com igual volume de uma solução metanólica de KOH 5-10%, e pode ser realizada a frio ou a quente, com ou sem evaporação do hexano. O extrato saponificado é transferido para um funil de separação com hexano e lavado com porções sucessivas da água, até a remoção completa do álcali. Após concentração, segue-se a separação cromatográfica.

Diferente da técnica empregada pelo método de COST91 e da AOAC, no método de IVACG os carotenóides são separados individualmente em coluna aberta, empacotada com MgO:hiflosupercel (1:1). Os extratos não saponificados são eluídos com 50 mL de acetona 10% em hexano, enquanto que os saponificados requerem para a separação gradiente de solvente, éter etílico e acetona em hexano. A concentração é calculada através dos máximos de absorção e dos correspondentes valores de absortividade (DAVIES, 1976).

Assim como o método de COST91, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho utilizando o método do IVACG.

3.1.4. Método recomendado por Rodriguez-Amaya et alii

O método foi desenvolvido para a determinação completa de carotenóides (RODRIGUEZ et alii, 1976a), mas para a determinação apenas das pró-vitaminas pode ser bastante simplificado (RODRIGUEZ-AMAYA et alii, 1988). Basicamente consiste na homogeneização da amostra (a quantidade depende do conteúdo de carotenóides) em liquidificador com acetona fria,

seguido de filtração. A operação é repetida até que o resíduo se torne incolor. Os pigmentos são transferidos para o éter de petróleo, em funil de separação, adicionando-se pequenas porções da solução de pigmento em acetona ao éter, seguida pela lavagem com água para a retirada da acetona. Neste ponto o extrato é concentrado e segue para a cromatografia ou então é saponificado.

A saponificação é feita com igual volume de KOH 10% em metanol por uma noite, à temperatura ambiente. O extrato saponificado é colocado em funil de separação e lavado com várias porções de água até eliminação do álcali, e concentrado.

Os pigmentos são separados individualmente, utilizando coluna de MgO:hiflosupercel (1:1) desenvolvida com concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (1-15%). As frações são recolhidas e lavadas com água para remover a acetona, e para a retirada da água residual, Na₂SO₄ anidro é adicionado. As frações são evaporadas em evaporador rotatório, não permitindo que a temperatura ultrapasse os 35°C e colocada a volume. A concentração dos carotenóides é calculada através dos máximos de absorção e dos correspondentes valores de absortividades ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) tabelados por Davies (1976).

Existem na literatura vários trabalhos empregando este método, não só para a determinação do valor de vitamina A, mas também para a determinação completa de carotenóides em alimentos brasileiros (CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1981a,b; PADULA *et alii*, 1983; RODRIGUEZ-AMAYA *et alii*, 1983; PADULA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986, 1987; PENTEADO *et alii*, 1986; GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987, 1989, 1991; RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987; ALMEIDA & PENTEADO, 1987a,b, 1988; ARIMA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1988, 1990; PENTEADO & ALMEIDA, 1988; SANTOS *et alii*, 1988; HIANE & PENTEADO, 1989; RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 1989; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989, 1990, 1991a,b; KIMURA *et alii*, 1990, 1991; TRUJILLO *et alii*, 1990; CAVALCANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES, 1992).

Ainda para a separação de isômeros, o método adota uma recromatografia das frações isoladas em coluna de Ca(OH)_2 (Mallinkrodt) (BICKOFF *et alii*, 1949), desenvolvida com diferentes concentrações de éter etílico em éter de petróleo.

3.1.5. Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Muitos métodos para a determinação de pró-vitaminas A, utilizando CLAE vêm sendo reportados na literatura. Vantagens como rapidez, simplicidade, eficiência na separação, reprodutibilidade e exatidão, tem sido atribuídas a essa técnica.

A grande maioria dos métodos utiliza colunas de fase reversa (RP-C18) (ZACARIA *et alii*, 1979; MATUS *et alii*, 1981; BUSHWAY & WILSON, 1982; HSIEH & KAREL, 1983; TAKAGI, 1985; BUSHWAY, 1985, 1986; BUSHWAY *et alii*, 1986; BUREAU & BUSHWAY, 1986; QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986; SPEEK *et alii*, 1986, 1988; FISHER & KOCIS, 1987; PEPPING *et alii*, 1988; BIACS *et alii*, 1989), principalmente pelo menor risco de formação de artefatos em colunas menos polares (LAMBERT *et alii*, 1985). Colunas de MgO não são estáveis, segundo VECCHI *et alii* (1981), entretanto se mostraram bastante eficientes na separação de carotenóides de frutas cítricas (STEWART, 1977a,b). Sílica, assim como também em coluna aberta, promove degradação dos carotenóides dentro da própria coluna (BRAUMAN & GRIMME, 1981).

As fases móveis mais utilizadas são combinações de acetonitrila, metanol, tetrahydrofurano, clorofórmio e hexano usadas isocraticamente, já que a eluição por gradiente requer longos períodos entre as corridas para equilíbrio do sistema (ZACARIA *et alii*, 1979; NELIS & LEENHEER, 1983).

Todavia, segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), numa revisão minuciosa sobre a determinação quantitativa de pró-vitamina A, a CLAE necessita de muito aprimoramento, mesmo porque o seu potencial não tem sido todo aproveitado e os resultados apresentados utilizando essa técnica são divergentes.

Embora sempre citada como uma técnica rápida, muitas vezes os passos que antecedem o procedimento cromatográfico são longos e trabalhosos (ZACARIA et alii, 1979). Alguns autores tentam uma preparação de amostra mais rápida, excluindo principalmente a etapa da saponificação (BUSHWAY & WILSON, 1982; HSIEH & KAREL, 1983; PHILIP et alii, 1988), no entanto, esses procedimentos não podem ser utilizados para alimentos que possuam quantidades apreciáveis de ésteres de pró-vitaminas, como no caso de mamão.

A maioria dos trabalhos se limitam a quantificar apenas o β -caroteno (α -caroteno e β -criptoxantina ocasionalmente) e mesmo assim os dados se mostram conflitantes.

REEDER & PARK (1975) foram os primeiros a desenvolver um método por CLAE para a determinação de pró-vitamina A em suco de laranja. O método requer duas colunas, uma de Al_2O_3 para α - e β -caroteno e outra de sílica para β -criptoxantina. STEWART (1977a,b) simplificou o método utilizando apenas uma coluna de MgO , com um gradiente de eluição de acetona-hexano.

BUSHWAY & WILSON (1982) elaboraram uma metodologia por CLAE para a determinação de α - e β -caroteno em hortaliças. O mesmo método foi empregado por BUREAU & BUSHWAY (1986) em 22 frutas e hortaliças, determinando também a β -criptoxantina. Quatorze desses alimentos tiveram valores de vitamina A bem diferentes daqueles relatados em tabelas de composição de alimentos dos EUA.

SPEEK et alii (1988) determinaram o valor vitamínico A de 55 frutas e hortaliças da Tailândia, utilizando um método por CLAE anteriormente desenvolvido por eles (SPEEK et

alii, 1986) e em geral o valor de vitamina A encontrado foi menor que o relatado no "Thai Food Composition Table" de 1978. A mesma metodologia foi empregada por PEPPING et alii (1988) modificando apenas a fase móvel, para determinar o conteúdo de α - e β -caroteno de vários alimentos do oeste da África.

QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) desenvolveram um sistema por CLAE, utilizando fase reversa e metanol-clorofórmio (9:1) como fase móvel, onde era possível separar as principais pró-vitaminas, assim como algumas forma isoméricas.

PHILIP & CHEN (1988b) trabalhando com frutas, compararam o método de coluna convencional e CLAE quantificando β -caroteno, β -criptoxantina e os ésteres de criptoxantina. Os resultados obtidos por CLAE foram na sua maioria superiores aos por coluna aberta. GREGORY et alii (1987) já haviam conseguido uma boa resolução de ésteres de carotenóides inativos por CLAE, demonstrando a potencialidade da técnica na separação dos ésteres de pró-vitaminas.

MEJIA et alii (1988) determinaram o valor de vitamina A de 5 diferentes cultivares de pimenta, utilizando CLAE. No geral os resultados foram superiores aos encontrados na tabela de composição de alimentos do México e menores que os apresentados pelo INCAP/ICNND (LEUNG & FLORES, 1961).

Utilizando fase reversa e gradiente, formado por uma mistura ternária de solventes, HEINONEM et alii (1989) determinaram o teor de vitamina A de 60 frutas e hortaliças. Prosseguindo o trabalho, HEINONEM (1990) determinou, utilizando a mesma técnica, o valor vitamínico de diferentes cultivares de cenouras.

TEE & LIM (1991b) compararam o método oficial da AOAC com um método por eles desenvolvido utilizando CLAE, em 40 hortaliças e 14 frutas. Principalmente nos alimentos onde quantidades expressivas de outros carotenóides pró-vitamínicos estão presentes, o valor de vitamina A obtido pelo método da AOAC foi bem inferior ao obtido por CLAE. Por outro lado, em alimentos

onde a concentração de β -caroteno é expressiva, ocorreu o inverso.

CARVALHO *et alii* (1992) compararam um método por CLAE, utilizando fase reversa, e quantificação por padronização interna e externa, com o método por coluna aberta de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) para a determinação de pró-vitamina A. Os autores obtiveram a mesma performance utilizando as duas técnicas.

Poucos foram os métodos que apresentaram boa resolução, principalmente em relação aos isômeros das pró-vitaminas, e existe dificuldade na obtenção de padrões adequados para uma calibração correta. A normalização ou o cálculo da % das áreas dos picos a partir da área total, conduzem a falsos resultados, já que as diferentes pró-vitaminas apresentam diferentes coeficientes de absorvidade e máximos de absorção em diferentes comprimentos de onda.

Padrões de α - e β -caroteno são os mais comumente encontrados no comércio, mas estudos feitos por QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) e CRAFT *et alii* (1990) demonstraram a grande variação no grau de pureza desses padrões (0,6 a 88,7%) entre alguns dos maiores distribuidores. Os padrões são altamente instáveis (VECCHI *et alii*, 1981; QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986; THOMPSON, 1986; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989) e sofrem rápida degradação. Padrões para as outras pró-vitaminas, que não são comercializados, são frequentemente obtidos de fontes naturais e purificados utilizando colunas abertas ou coletados após várias injeções no CLAE, utilizando de preferência colunas preparativas (ISAKEN & FRANCIS, 1989). Por isso a padronização interna possui algumas vantagens sobre a padronização externa, e para tal KHACHIK & BEECHER (1985) utilizaram decapreno- β -caroteno e QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) e CARVALHO *et alii* (1992) o SudanI.

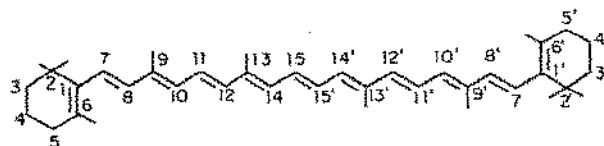
3.1.6. Isômeros de pró-vitaminas A

Os carotenóides existem na natureza sob a forma mais estável que é a configuração *trans*. No entanto algumas formas *cis* podem ocorrer naturalmente (GOODWIN, 1976). Os dois primeiros carotenóides na rota biossintética, fitoeno e fitoflueno, existem predominantemente na configuração 15-*cis*. A presença de pequenas quantidades de *cis*-isômeros de outros carotenóides tem sido cada vez mais reportada na literatura.

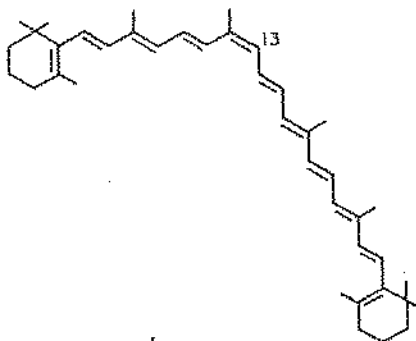
A isomerização é uma das propriedades largamente conhecidas dos carotenóides, e os isômeros são por muitos pesquisadores considerados artefatos, formados durante o processamento e as etapas analíticas (SWEENEY & MARSH, 1970; LEE & AMMERMAN, 1974; OGUNLESI & LEE, 1979; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987, 1988). Segundo LAWRENCE *et alii* (1988) há uma maior tendência à isomerização do β -caroteno que a degradação. Condições de aquecimento e pH baixo favorecem a isomerização dos carotenóides, e isso ocasiona uma diminuição da cor e redução da potencialidade dos carotenóides ativos como precursores vitamínicos (ZECHMEISTER, 1949; DEUEL, 1957; SINGLETON *et alii*, 1961; GORTNER & SINGLETON, 1961; SWEENEY & MARSH, 1971a,b, 1973). Extensivos estudos feitos por ZECHMEISTER (1944, 1960), observando os efeitos da luz e do aquecimento sobre padrões de *trans*-carotenóides, estabeleceram que por razões estéricas dos pigmentos a formação das configurações 9-*cis* e 13-*cis* eram favorecidas (FIGURA 2). TSUKIDA *et alii* (1981) e VECCHI *et alii* (1981) fizeram um detalhamento desses rearranjos para o β -caroteno.

O uso de agentes neutralizantes na etapa de extração, na tentativa de neutralizar os ácidos que são liberados durante a preparação da amostra, faz parte de uma série de métodos (CURL, 1962, 1964, 1967; STEWART & WHEATON, 1973;

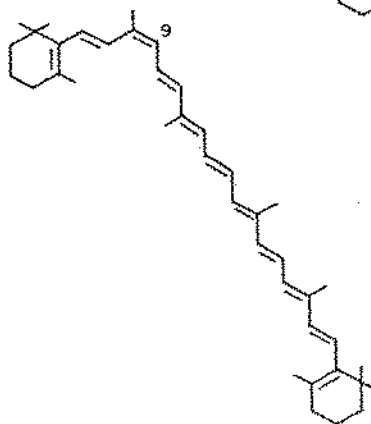
Trans- β -caroteno



13-cis- β -caroteno



9-cis- β -caroteno



15-cis- β -caroteno

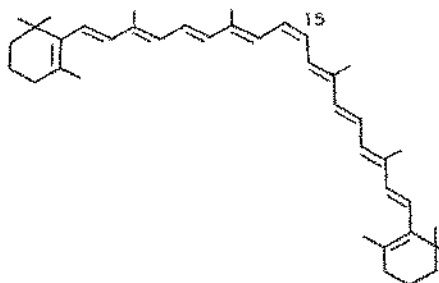


FIGURA 2: Estrutura dos principais isômeros do β -caroteno.

STEWART, 1977a,b; BUSHWAY & WILSON, 1982; STANNCHER & ZONTA, 1982; NOGA & LENZ, 1983; BUSHWAY, 1985; BUREAU & BUSHWAY, 1986; KHACHIK *et alii*, 1986; PHILIP & CHEN, 1988a,b; DEUTSCH, 1990). No entanto SCHWARTZ & PATRONI-KILLAM (1985), utilizando CLAE, não detectaram a presença de isômeros *cis* em soluções de β -caroteno em éter de petróleo, mantidas em soluções tampão com faixa de pH de 1 a 7, indicando que a acidez dos alimentos não era responsável pela isomerização do β -caroteno. RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) também constataram a não necessidade do uso desses agentes neutralizantes, desde que a análise seja feita no menor tempo possível, com os carotenóides protegidos da luz e de altas temperaturas.

Com o processamento de frutas e hortaliças, vários autores observaram a redução da forma *trans* com o concomitante aumento das formas isoméricas (PANALAKS & MURRAY, 1970; SWEENEY & MARSH, 1971b; LEE & AMMERMAN, 1974; OGULENSI & LEE, 1979; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; QUACKENBUSH, 1987). Segundo SWEENEY & MARSH (1971b) houve uma perda de 15-35% do valor de vitamina A, ocasionada pela conversão do *trans*- β -caroteno para suas formas isoméricas em hortaliças processadas. LAWRENCE *et alii* (1988) verificaram que durante o processamento térmico de batata-doce ocorreu a formação de isômeros, predominantemente do 13-*cis*- β -caroteno, e a quantidade formada estava relacionada com a severidade e o tempo do tratamento térmico.

Já que o valor de vitamina A pode ser reduzido pela conversão das formas pró-vitamínicas *trans* em *cis*, pois os *cis*-isômeros apresentam atividade vitamínica menor (ZECHMEISTER, 1962) (TABELA 4), a separação e quantificação devem ser feitas individualmente para cada isômero (BICKOFF *et alii*, 1949; SWEENEY & MARSH, 1970; GEBHARDT *et alii*, 1977; SCHWARTZ & PATRONI-KILLAM, 1985; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; LESELLIER *et alii*, 1989; CRAFT *et alii*, 1990; PETTERSSON & JONSSON, 1990; O'NEIL *et alii*, 1991; SALEH & TAN, 1991; RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES, 1992).

Os métodos utilizados para a separação e quantificação de isômeros, no entanto, são difíceis e pouco

TABELA 4: Bioatividade dos isômeros das principais pró-vitaminas A.

pró-vitaminas	bioatividade (%) ^a
13- <i>cis</i> - α -caroteno	13
<i>trans</i> - α -caroteno	50-54
9- <i>cis</i> - α -caroteno	16
13- <i>cis</i> - β -caroteno	53
<i>trans</i> - β -caroteno	100
9- <i>cis</i> - β -caroteno	38
15- <i>cis</i> - β -caroteno	nd
<i>trans</i> - γ -caroteno	27-42
neo- γ -caroteno	19
<i>trans</i> - β -criptoxantina	57
neo- β -criptoxantina U	27
neo- β -criptoxantina A	42

^a DEUEL *et alii* (1944, 1945) e ZECHMEISTER (1962)
 nd - não determinado

reprodutíveis. Métodos utilizando cromatografia de coluna aberta necessitam de recromatografia das frações isoladas em colunas de MgO:hiflosupercel em colunas de Ca(OH)_2 ou $\text{Ca(OH)}_2\text{-Mg(OH)}_2$ (BICKOFF et alii, 1949; PANALAKS & MURRAY, 1970; SWEENEY & MARSH, 1970; LEE et alii, 1981, 1984; SADOWSKI & WOJCIK, 1983; EDWARDS & LEE, 1986; LEE, 1986; RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES, 1992).

Em 1970, SWEENEY & MARSH desenvolveram um método para a separação de isômeros de α - e β -caroteno em hortaliças, recromatografando separadamente as frações isoladas em coluna de MgO:hiflosupercel (1:2), em coluna de $\text{Ca(OH)}_2\text{-Mg(OH)}_2$ desenvolvida com 0,5-1,5% de p-metilanisol em éter de petróleo. Os principais isômeros do β -caroteno foram o neo- β -caroteno B e o neo- β -caroteno U, que eluíram antes e depois do *trans* β -caroteno, respectivamente (ZECHMEISTER, 1960). O método foi utilizado por SWEENEY & MARSH (1971b) para estudar os efeitos do processamento em hortaliças, e por GEBHARDT et alii (1977) em pêssegos. Esses isômeros mostraram ser o 13-*cis* e 9-*cis* com base nos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (TSUKIDA et alii, 1981).

Segundo SCHWARTZ & PATRONI-KILLAM (1985) a separação dos isômeros pode ser feita utilizando Ca(OH)_2 como adsorvente em cromatografia de camada delgada. Nenhuma forma isomérica foi encontrada quando aplicou-se padrões de α - e β -caroteno *trans*, o que demonstra que as formas *cis* não foram formadas durante a separação. Analisando hortaliças verdes e amarelas, os autores observaram que todas as hortaliças frescas verdes apresentavam isômeros. Sabe-se que a clorofila influencia na fotoisomerização de certos carotenóides através do mecanismo de transferência de energia e esse é um fator importante a ser considerado durante o trabalho com a amostra.

RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES (1992) observaram a importância da separação de *cis* isômeros na determinação do valor de vitamina A de produtos processados de tomate. As amostras "in natura" não tinham tais isômeros. Os autores concluíram que, nos produtos processados realmente há uma superestimação do valor

vitamínico quando a separação dos isômeros não é realizada, mas que a magnitude depende de como são feitos os cálculos. Demonstraram a necessidade em se estabelecer as verdadeiras biopotências das formas isoméricas.

Devido a alta resolução e melhor reprodutibilidade que a CLAE apresenta sobre a cromatografia de coluna aberta (RUEDI, 1985), essa técnica tem sido ultimamente muito estudada na tentativa de se obter a composição completa dos carotenóides e as respectivas formas isoméricas, sem a necessidade da recromatografia. Infelizmente nenhum método ainda foi capaz de satisfazer esse desejo, e a maioria dos trabalhos encontrados na literatura só levam em consideração as formas *cis* do β -caroteno, as vezes do α -caroteno também, desconsiderando as outras pró-vitaminas. Mesmo quando a separação dos isômeros foi obtida, não se determinou a concentração absoluta.

As primeiras tentativas para a separação de isômeros por CLAE foram feitas utilizando colunas de Al_2O_3 (VECCHI *et alii* 1981) e $Ca(OH)_2$ (TSUKIDA *et alii*, 1982; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987, 1988; PETERSON & JONSSON, 1990).

VECCHI *et alii* (1981) separaram 12 isômeros de β -caroteno fotoisomerizado usando coluna de Al_2O_3 . Entretanto, para compensar a menor seletividade da Al_2O_3 em relação ao $Ca(OH)_2$, várias modificações no equipamento foram necessárias, principalmente para manter a temperatura e a quantidade de água da fase móvel.

TSUKIDA *et alii* (1982) separaram 17 isômeros do β -caroteno produzidos por fotoisomerização, utilizando coluna de $Ca(OH)_2$ desenvolvida com 0,1 ou 0,5% de acetona em hexano. CHANDLER & SCHWARTZ (1987), empregando o mesmo tipo de coluna e acetona:hexano (3:997) como fase móvel, separaram isômeros de α - e β -caroteno de frutas e hortaliças. PETERSON & JONSSON (1990) na tentativa de uma separação mais rápida e picos sem caudas na coluna de $Ca(OH)_2$, utilizaram gradiente de eluição e sistema de aquecimento na coluna. Embora os isômeros tenham sido detectados,

a quantificação foi dada em termos de α - e β -caroteno, sem distinguir os isômeros. Esses trabalhos enfatizaram os problemas em se obter e manter padrões de *cis*-carotenóides para a quantificação e a sensibilidade do Ca(OH)_2 à água e outros solventes polares. Ainda, a eluição final do isômero do α -caroteno se sobrepõe ao início da eluição do isômero do β -caroteno.

BUSHWAY (1985), testando 2 colunas de fase normal (Al_2O_3 e NH_2) e 4 colunas de fase reversa C18, obteve cromatogramas que demonstravam nitidamente a dificuldade em separar os diferentes carotenóides e seus isômeros, principalmente devido a complexidade da composição de carotenóides nos alimentos.

Normalmente a fase móvel utilizada para a separação de isômeros em colunas de fase normal é o n-hexano com pequenas quantidades de acetona e isopropanol. Com relação à fase estacionária poucas são as marcas de Ca(OH)_2 que produzem uma separação eficiente (SCHWARTZ & PATRONI-KILLAN, 1985; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; CRAFT *et alii*, 1990), e seu uso requer o controle de uma série de condições, porém o mais crítico é que essas colunas não são encontradas comercialmente.

A utilização de fase reversa ainda não apresentou com sucesso uma separação dos isômeros, principalmente devido às características similares desses compostos (BUSHWAY & WILSON, 1982; STANCHER & ZONTA, 1982; BEECHER & KHACHIK, 1984; GRANADO *et alii*, 1991). No entanto, muitos trabalhos empregam esse tipo de coluna, principalmente pelo fato de serem encontradas comercialmente.

QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) testaram mais de 20 colunas comerciais de fase reversa C18 e C8, e somente 3 colunas C18 poliméricas demonstraram a capacidade em separar os isômeros do β -caroteno, sendo a Vydac 201 TP a mais efetiva. Utilizando esse tipo de coluna e metanol:clorofórmio (94:6) como fase móvel, QUACKENBUSH (1987) analisou alguns alimentos e os resultados

confirmaram as observações feitas por SWEENEY & MARSH (1970), que em hortaliças verdes a proporção de 9-*cis* em relação ao 13-*cis* é maior, enquanto que em alimentos não verdes o 13-*cis* é o predominante. Os alimentos cozidos apresentavam no geral uma quantidade de isômero 10 vezes maior que os alimentos crus.

Cis-isômeros apareciam como um ombro e foram quantificados com o *trans*- β -caroteno por KHACHIK *et alii* (1986, 1989, 1991, 1992), KHACHIK & BEECHER (1987, 1988) e HEINONEN *et alii* (1989), utilizando colunas de C18 com gradiente de solventes para a eluição.

CRAFT *et alii* (1990) compararam 5 marcas de colunas C18, escolhendo a Vydac 201 TP com metanol:água (97:3) como fase móvel para a separação de isômeros de preparações comerciais de β -caroteno. O grau de pureza do β -caroteno variou de 7 a 83%, semelhante ao observado por QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986). Os dados quantitativos foram calculados em porcentagem, isto é de forma estimativa, já que os isômeros possuem diferentes coeficientes de absorção e absorção máxima a diferentes comprimentos de onda. Para avaliar o valor nutritivo dos alimentos, a concentração absoluta é necessária.

O'NEIL *et alii* (1991) recentemente avaliaram 3 colunas C18 e de Ca(OH)_2 e vários sistemas de solventes, verificando ser a Vydac 201 TP e a de Ca(OH)_2 as colunas mais efetivas. As colunas de Ca(OH)_2 foram mais eficientes para separar o 15-*cis* do 13-*cis*- β -caroteno, enquanto que a Vydac teve uma melhor resolução para separar o 9-*cis* do 13-*cis*- β -caroteno.

Alguns autores relatam que a utilização de solventes halogenados promovem a isomerização de polienos conjugados (MULRY *et alii*, 1983; PESEK *et alii*, 1990), no entanto SALEH & TAN (1991) trabalhando em sistemas com e sem diclorometano, um dos solventes mais utilizados em CLAE, obtinham a mesma proporção de isômeros, provavelmente pelo pequeno tempo de exposição do pigmento com o solvente.

KHACHIK *et alii* (1989) encontraram que interações entre as moléculas de carotenóides, o solvente de injeção e a fase móvel podem produzir picos-artefatos na CLAE, os quais podem ser confundidos como impurezas ou *cis*-carotenóides. Solventes de injeção como cloreto de metileno, clorofórmio, tetrahidrofurano, benzeno e tolueno em colunas de C18 desenvolvida com uma mistura de metanol, acetonitrila, hexano e cloreto de metileno produzem esses artefatos. A distorção dos picos e a formação de picos múltiplos pode ser evitada injetando-se amostras concentradas em pequenos volumes.

SCHMITZ *et alii* (1989) foram capazes de separar *cis* isômeros de α - e β -caroteno por cromatografia capilar de fluido supercrítico, mas esse método possui certas limitações, principalmente no que diz respeito à quantidade de amostra injetada na coluna, que é muito pequena. Por outro lado não é um método simples e pelos dados apresentados pelos autores (baixa resolução) não seria possível aplicá-lo universalmente nem para a separação de todas as pró-vitaminas, muito menos para a separação de suas formas isoméricas.

A separação de isômeros da β -criptoxantina por CLAE ainda não foi reportada na literatura.

Cis/trans isômeros podem ser inicialmente identificados pela mudança nos máximos de absorção na presença de iodo (LIAAEN-JENSEN, 1971, 1973) e pela presença do chamado "pico *cis*" (ZECHMEISTER, 1943; KARRER & JUCKER, 1950; SCOTT, 1964). Os isômeros *cis* do α - e β -caroteno absorvem em comprimento de onda máximo menor que a forma *trans*, aproximadamente 2 a 5 nm para os mono-*cis*, 10 nm para os di-*cis* e pode chegar a 50 nm para os poli-*cis* (SCOTT, 1964; WEEDON, 1971). O pico *cis* é um novo máximo de absorção na região do UV (330-350 nm) e se localiza aproximadamente 140 nm, medido em hexano e éter de petróleo, abaixo do comprimento de onda máximo (VETTER *et alii*, 1971; DAVIES, 1976). Os carotenóides mono-*cis* centrais possuem esse pico mais intenso que os mono-*cis* laterais.

O valor da absorptividade molar no comprimento de onda máximo e no pico *cis* varia de isômero para isômero, e essa característica qualitativa permite a identificação, embora não conclusiva, desses compostos através da chamada "razão Q" (absorção no comprimento de onda máximo/ absorção no pico *cis*).

Entretanto há na literatura muitos resultados conflitantes no que concerne a identificação dos isômeros. Muitos pesquisadores encontraram em frutas, hortaliças e formulações de β -caroteno, o 13-*cis* e 9-*cis* como os isômeros predominantes (CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; QUACKENBUSH, 1987; TSUKIDA *et alii*, 1982). BUSHWAY (1986) analisando hortaliças verdes detectou o 9-*cis* e o 15-*cis*, enquanto que KHACHIK *et alii* (1986) e KHACHIK & BEECHER (1987) só o 15-*cis* (TABELA 5). Em estudos mais recentes, essas frações estão sendo colecionadas em quantidades suficientes para uma identificação mais definitiva por RMN (ressonância magnética nuclear).

Para calcular a porcentagem de cada isômero presente CHANDLER & SCHWARTZ (1987) adotaram o chamado ponto isobéptico a 436 nm, observado quando os espectros de absorção dos isômeros, individualmente obtidos a partir de soluções de mesma concentração, são sobrepostos. Nesse ponto é assumido que os valores das absorptividades dos isômeros são iguais (KLAUI & BAUERFEIND, 1981), o que permite o cálculo da porcentagem de cada isômero a partir de uma única curva padrão, a do *trans*- β -caroteno. CHANDLER & SCHWARTZ (1988) fizeram a quantificação dos isômeros de β -caroteno de batata-doce utilizando esse método. O'NEIL *et alii* (1991) encontraram o ponto isobéptico a 410 nm, e segundo os autores essa discrepância se deve principalmente a coeluição dos isômeros e os espectros obtidos de misturas, já que não há padrões puros disponíveis.

Nos poucos trabalhos que tentaram a quantificação, somente as porcentagens foram apresentadas. Em nenhum estudo por CLAE os valores de pró-vitamina A foram convertidos em equivalentes de retinol.

TABELA 5: Isômeros do β -caroteno reportados na literatura

referência	isômeros encontrados					amostras analisadas
	trans	9-cis	13-cis	15-cis	outros	
TSUKIDA <i>et alii</i> (1981)	X	X	X	X	X	β -caroteno isomerizado ^a
CHANDLER & SCHWARTZ (1987)	X	X	X	X		frutas e vegetais, β -caroteno isomerizado ^a
JENSEN <i>et alii</i> (1964)	X	X	X	X		β -caroteno fotoisomerizado
QUACKENBUSH (1987)	X	X	X			frutas e vegetais, β -caroteno isomerizado ^a
BUSHWAY (1986)	X	X		X		frutas e vegetais, β -caroteno isomerizado ^a
KHACHIK <i>et alii</i> (1986)	X			X		vegetais
KHACHIK & BEECHER (1987)	X			X		vegetais
BEN-AMOTZ <i>et alii</i> (1988)	X	X				algas ^b

^a β -caroteno isomerizado ou por tratamento térmico ou por reação catalisada por iodo

^b *Dunaliella bardawil*

referência: O'NEIL *et alii* (1991)

3.2. Métodos Analíticos para a Determinação de Carotenóides

Os carotenóides são os pigmentos mais amplamente distribuídos na natureza, estão presentes em plantas, em alguns animais, fungos e bactérias. São formados por 8 unidades de isopreno (C_5H_8) unidas por ligações tipo "cabeça-cauda", com exceção da posição central onde a ligação é do tipo "cauda-cauda". O sistema de duplas ligações conjugadas é o responsável pela cor amarela ao vermelho que esses pigmentos apresentam. Podem ser classificados em dois grandes grupos: carotenos (hidrocarbonetos) e xantofilas (hidrocarbonetos oxigenados).

Os carotenóides diferem no grau de saturação, ciclização, grupos funcionais e no número de carbonos do esqueleto. São bastante susceptíveis à isomerização e oxidação (DAVIES, 1976; LIAAEN-JENSEN, 1971).

Devido às várias funções que lhes são atribuídas, esses compostos despertaram o interesse de muitos pesquisadores em diversas áreas. Em alimentos, a sua atuação como corante natural e precursor de vitamina A são bem conhecidas. Recentemente voltaram a ocupar lugar de destaque, devido a estudos que demonstram que alguns carotenóides, mesmo aqueles que não possuem atividade pró-vitamínica, exercem outras funções fisiológicas, tais como prevenção de determinados tipos de câncer, proteção da mucosa contra úlceras gástricas e aumento da resposta imunológica a determinados tipos de infecção (MOSZIK *et alii*, 1983; JAVOR *et alii*, 1983; ONG & CHYTIL, 1983; MATHEUS-ROTH, 1985; COLDITZ *et alii*, 1985; RITEMBAUGH, 1987; BENDICK, 1989a; ZIEGLER, 1989; KRINSKY, 1989). Assim o consumo de alimentos ricos em carotenóides tem sido recomendado.

Segundo dados de PADULA & RODRIGUEZ-AMAYA (1987), GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1987) e RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES (1992)

a composição completa de carotenóides é também um parâmetro importante, do ponto de vista tecnológico, já que durante o processamento a cor dos alimentos e sua retenção dependem do tipo e quantidade dos pigmentos presentes

Devido a essas informações, muitos autores, já a alguns anos, vem se dedicando para estabelecer uma metodologia adequada para a determinação da composição completa de carotenóides. No entanto ainda existem muitos resultados divergentes, principalmente em consequência das diferenças existentes entre os próprios procedimentos analíticos, e a composição diversificada dos carotenóides nos alimentos.

Entre os vários capítulos e revisões sobre métodos analíticos para determinação de carotenóides (LIAAEN-JENSEN, 1971; VETTER *et alii*, 1971; WEEDON, 1971; DAVIES, 1976; MOSS & WEEDEN, 1976; GOODWIN, 1980; DE RITTER & PURCELL, 1981; TAYLOR, 1983; TEE & LIM, 1991a) poucos se preocuparam em estabelecer métodos quantitativos. De fato, segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), a maioria dos trabalhos publicados sobre carotenóides é essencialmente qualitativo.

Devido à susceptibilidade à degradação, para a execução de qualquer etapa analítica, é necessário tomar certos cuidados a fim de resguardar a integridade dos carotenóides ao final de cada etapa

3.2.1. Extração

Nenhum método de extração pode ser aplicado para todas as amostras e adotado como uma técnica padrão. Deve ser sempre adaptado à amostra devido a diferente distribuição e

ocorrência dos carotenóides nos diferentes tipos de alimentos. Solventes orgânicos miscíveis em água, tais como acetona, metanol e etanol (DAVIES, 1976), são os mais indicados para a extração dos carotenóides, isso porque as amostras frescas possuem alta porcentagem de água e os carotenóides são na sua grande maioria lipossolúveis. A extração para amostras secas pode ser feita com solventes imiscíveis em água (éter de petróleo, hexano, éter etílico).

Outros solventes e misturas já foram empregados, tais como álcool isopropílico, hexano-acetona ou éter de petróleo-acetona (em diversas proporções), éter de petróleo-isopropanol e diclorometano-metanol. QUACKENBUSH *et alii* (1970) empregaram uma mistura de hexano-acetona-etanol-tolueno para a extração dos pigmentos por uma noite. EDWARDS & LEE (1986) não encontraram diferença significativa no conteúdo de carotenóides totais de cenouras extraídas com acetona e com metanol.

Com a introdução da CLAE, novas opções de solventes surgiram. Segundo KHACHIK *et alii* (1986) o tetrahidrofurano (THF) é o solvente mais adequado para a extração dos pigmentos de hortaliças. Além de solubilizar com facilidade os carotenóides tem o poder de desnaturar proteínas complexadas com os mesmos, prevenindo assim a formação de emulsão. Entretanto, não houve diferença significativa entre as composições quali e quantitativa de amostras extraídas com THF, éter de petróleo-acetona e éter etílico-metanol. Mesmo assim o THF foi utilizado em vários trabalhos (MEJIA *et alii*, 1988; KHACHIK & BEECHER, 1987, 1988; KHACHIK *et alii*, 1989).

Agentes antioxidantes recomendados por DAVIES (1976), com o objetivo de prevenir a perda de carotenóides por oxidação durante as análises, tem sido empregados. Entre eles o pirogalol (THOMPSON & MAXWELL, 1977; EDWARDS & LEE, 1986), ácido ascórbico (GROSS *et alii*, 1971), ascorbato de sódio (SPEEK *et alii*, 1986) e hidroquinona (BALOCH *et alii*, 1977). No entanto, o hidroxibutiltolueno (BHT) parece ter a preferência dos

pesquisadores (STEWART & WHEATON, 1972; REEDER & PARK, 1975; STEWART, 1977a; KLEIN & PERRY, 1982; NOGA & LENZ, 1983; NIEREMBERG, 1985; BUREAU & BUSHWAY, 1986; TAN *et alii*, 1986; SPEEK *et alii*, 1988; LAURENCE *et alii*, 1988; KHACHIK & BEECHER, 1988; KHACHIK *et alii*, 1989; CHEN & YANG, 1992).

PARRISH (1977) não observou nenhum efeito causado pela adição desses agentes. Já segundo QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) a adição de antioxidantes deve ser feita com cautela, pois a maioria das frutas e hortaliças contém antioxidantes naturais e uma quantidade excessiva desses agentes pode resultar numa autooxidação dos carotenóides.

O uso de agentes neutralizantes, recomendado para neutralizar os ácidos que são liberados durante a etapa de extração e que podem promover a isomerização dos carotenóides, também faz parte de alguns métodos, inclusive da AOAC. Entre os agentes neutralizantes o mais utilizado é $MgCO_3$.

Normalmente a extração completa envolve operações sucessivas até a retirada quantitativa do pigmento, com ou sem trituração da amostra. Muitas impurezas co-extraídas são removidas através de partição, e o passo seguinte, geralmente, é a saponificação.

3.2.2. Saponificação

A etapa de saponificação justifica-se pela necessidade de hidrolisar os ésteres de carotenóides e remover lípidios e clorofilas, que podem interferir na análise (LIAAEN-JENSEN, 1971; DAVIES, 1976).

Basicamente a técnica consiste na adição de uma solução metanólica de KOH ao extrato do pigmento em éter de petróleo ou hexano. Pode ser realizada a quente ou a temperatura ambiente. Diversas formas de saponificação, com diferentes concentrações de KOH, tempo e temperatura, foram empregadas, embora poucos estudos avaliaram o mérito desses procedimentos e várias opiniões divergentes foram citadas com relação a ocorrência ou não de perdas de carotenóides durante a saponificação.

BUSHWAY & WILSON (1982) não encontraram diferença significativa nos teores de α - e β -caroteno entre amostras saponificadas e não saponificadas, embora as condições não tenham sido especificadas. BARANYAI *et alii* (1982) constataram que a saponificação realizada à temperatura ambiente por 16 horas, com solução metanólica de KOH a 30%, não causou perda no conteúdo de carotenóides. Porém, KHACHIK *et alii* (1986) reportou uma perda de 6% de β -caroteno e de 17-84% de outros carotenóides de brócolis, como resultado da saponificação com 30% de KOH/metanol, à temperatura ambiente por 3 horas.

SCHWARTZ & PATRONI-KILLAM (1985) não observaram nenhuma diferença no número de isômeros de α - e β -caroteno após a etapa de saponificação, com solução saturada de KOH durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

TAYLOR *et alii* (1987) verificaram os efeitos da saponificação com a utilização de diferentes concentrações de KOH (6 a 30%), diferentes temperaturas (temperatura ambiente a 60°C) e variando o tempo de saponificação (1,5 a 18 horas). O parâmetro mais crítico foi a concentração do álcali, levando a perdas significativas, especialmente das xantofilas.

Numa comparação entre 6 procedimentos mais comuns de saponificação, verificou-se que a perda quantitativa, assim como a formação de artefatos (*cis* isômeros e epóxidos), ocorria quando as condições empregadas eram mais drásticas, como alta temperatura, maior concentração de KOH e maior exposição do

pigmento com o álcali (KIMURA *et alii*, 1990). A magnitude da degradação variava também com o tipo de carotenóide, as xantofilas parecem ser mais susceptíveis.

Em amostras contendo apo-carotenóides, toda a acetona utilizada na extração deve ser eliminada antes da saponificação, já que traços de acetona podem promover a reação de condensação aldólica com esses pigmentos na presença de KOH, formando metil-cetonas (SCHMIDT *et alii*, 1971; STEWART & WHEATON, 1973).

3.2.3. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Os métodos de separação de carotenóides são cromatográficos e podem ser divididos segundo a técnica utilizada.

O primeiro método empregado para a separação individual dos carotenóides foi a cromatografia em papel (BAYFIELD *et alii*, 1967; KATAYAMA *et alii*, 1971; SHERMA, 1971), embora os pigmentos estivessem sujeitos à degradação e isomerização, assim como em camada delgada (TAYLOR, 1983). A grande capacidade para separação de compostos na cromatografia gasosa incentivou a utilização dessa técnica, no entanto para carotenóides, devido a sua baixa volatilidade e termolabilidade (LIAAEN-JENSEN, 1971; TAYLOR & DAVIES, 1975), os resultados não foram satisfatórios.

Poucos são os trabalhos encontrados em carotenóides empregando camada delgada (CCD). Na realidade a CCD é uma técnica particularmente útil quando usada em combinação com outras técnicas, para a separação e purificação das frações de

carotenóides, ou no acompanhamento de reações químicas, úteis na identificação (TAYLOR, 1983). DAVIES (1976) descreve alguns aspectos práticos para a utilização da CCD na análise de carotenóides, incluindo a escolha de adsorventes, preparação e corrida dos cromatogramas, detecção e eluição dos carotenóides. Em análise quantitativa, além da grande possibilidade de degradação devido a maior exposição (LIAAEN-JENSEN, 1971), a aplicação da amostra e a retirada dos componentes isolados são operações difíceis de serem realizadas quantitativamente (MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

3.2.3.1. Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CCA)

Tem sido a técnica mais utilizada para a separação de carotenóides em alimentos. Vários adsorventes podem ser utilizados e uma série de combinações destes são encontradas nas revisões de DAVIES (1976) e TAYLOR (1983), além de várias considerações práticas para o uso da técnica e preparação da coluna. Segundo DAVIES (1976) os carotenos são melhores resolvidos em coluna de Ca(OH)_2 ou Al_2O_3 , os carotenóides de polaridade intermediária em CaCO_3 e MgO , enquanto que as xantofilas requerem adsorventes menos ativos, como a celulose. A sílica gel deve ser utilizada com cautela, pois pode levar à degradação e isomerização (STRAIN *et alii*, 1967; RODRIGUEZ *et alii*, 1976b; TANAKA *et alii*, 1981; TAYLOR, 1983).

Estudando o efeito de diferentes adsorventes, TANAKA *et alii* (1981) observaram que o MgO causou menor, enquanto que a sílica gel maior alteração no espectro do β -caroteno. CHEN & YANG (1992) verificaram que sílica gel também não promovia a separação de carotenóides. RODRIGUEZ *et alii* (1976b) observaram a

hidroxilação na posição 4 do anel quando o β -caroteno foi exposto ao micro-Cel C. Os mesmos autores verificaram a perda de β -caroteno quando exposto à Al_2O_3 , sílica gel, MgO, celite e hiflosupercel, constatando a menor perda (1%) quando exposto ao hiflosupercel.

A maioria dos pesquisadores utilizam colunas ativadas ou não de MgO:hiflosupercel nas proporções de 1:1 ou 1:2 (LEVIS & MERROW, 1962; BROSSARD & MACKINNEY, 1963; SUBARAYAN & CAMA, 1964; YOKOYAMA & VANDERCOOK, 1967; RYMAL & NAKAYAMA, 1974; GROSS *et alii*, 1971, 1972, 1973; RODRIGUEZ, 1976a; RAHMAN & BUCKLE, 1980; CECCHI & RODRIGUEZ-AMAYA, 1981a,b; KLEIN & PERRY, 1982; RODRIGUEZ-AMAYA *et alii*, 1983; PADULA *et alii*, 1983; PADULA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986, 1987; PENTEADO *et alii*, 1986; RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987; GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987, 1989, 1990, 1991; ALMEIDA & PENTEADO, 1987a,b, 1988; ARIMA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1988, 1990; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989, 1990, 1991a; PENTEADO & ALMEIDA, 1988; HIANE & PENTEADO, 1989; RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 1989; DEUTSCH, 1990; TRUJILLO-QUIJANO *et alii*, 1990; KIMURA *et alii*, 1991; RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES, 1992; CAVALCANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992; CARVALHO *et alii*, 1992; CHEN & YANG, 1992).

ROUCHAUD *et alii* (1984) foram os únicos pesquisadores a constatar perda significativa de carotenóides em coluna de MgO:hiflosupercel (1:1) ativado.

Éter de petróleo ou hexana e concentrações crescentes de éter etílico e acetona em éter de petróleo são as combinações de solventes mais utilizadas como fase móvel na determinação de carotenóides por coluna aberta.

3.2.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Embora a ênfase maior na utilização da CLAE esteja na determinação de pró-vitamina A, essa técnica vem sendo pesquisada para a separação completa de carotenóides. Contudo, ainda não se tornou um método bem estabelecido e de uso rotineiro. Nenhum procedimento com a composição completa de carotenóides se mostrou satisfatório. As mesmas considerações feitas em relação à CLAE para a determinação de pró-vitaminas A também se aplicam à determinação de carotenóides em geral, incluindo as vantagens e desvantagens.

A maioria dos métodos para a separação de carotenóides utiliza colunas de fase reversa, onde ocorrem ligações mais fracas com os pigmentos (ESKINS *et alii*, 1977; BRAUMANN & GRIMME, 1981; BARANYAI *et alii*, 1982; NOGA & LENZ, 1983; KHACHIK *et alii*, 1986; SIMON & WOLFF, 1987; KHACHIK & BEECHER, 1988; PHILIP & CHEN, 1988c; DAOOD *et alii*, 1989; KHACHIK *et alii*, 1992; ROUSEFF *et alii*, 1992). As fases móveis mais comuns são combinações de acetonitrila, diclorometano, THF, metanol e hexano.

Segundo RUEDI (1985) a grande vantagem da utilização da CLAE seria a alta capacidade de resolução, permitindo dessa forma determinar a composição completa de carotenóides, inclusive separando as formas isoméricas, sem a necessidade de recromatografar as frações não resolvidas, como ocorre em coluna aberta. No entanto nenhum método foi capaz de apresentar tal vantagem. BUSHWAY (1985) utilizando 6 colunas comerciais e vários sistemas de solventes obteve vários cromatogramas que demonstram a dificuldade na separação dos carotenóides.

3.2.4. Identificação e quantificação

Alguns parâmetros são muito úteis na identificação, tais como: (a) afinidade de adsorção na coluna (ordem de eluição) e na camada delgada (valores de Rf); (b) espectros de absorção; (c) reações químicas específicas e (d) espectroscopia de infra-vermelho (VETTER *et alii*, 1971; LIAAEN-JENSEN, 1971, 1973; MOSS & WEEDON, 1976; DAVIES, 1976; GOODWIN, 1980).

A confirmação da identidade de carotenóides já conhecidos pode ser obtida a partir de uma combinação criteriosa desses parâmetros mais tradicionais (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Mas, para a elucidação de estruturas de novos carotenóides, os cientistas devem recorrer a técnicas mais modernas e sofisticadas, como a espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

As concentrações são calculadas da mesma forma que para as pró-vitaminas. Para os métodos que utilizam CLAE, a quantificação é feita por normalização, padronização externa ou interna, tendo esta última a preferência dos pesquisadores. Cantaxantina, decapreno- β -caroteno, Sudan I e β -apo-8'-carotenal foram os padrões internos já utilizados (BARANYAI *et alii*, 1982; NOGA & LENZ, 1983; TAKAGI, 1985; KHACHIK *et alii*, 1986; SIMON & WOLFF, 1987; PHILIP & CHEN, 1988a,b,c; KHACHIK & BEECHER, 1988; KHACHIK *et alii*, 1989; CANO, 1991; KHACHIK *et alii*, 1991; KHACHIK *et alii*, 1992), no entanto, não existe ainda um padrão adequado. Esses padrões são pigmentos altamente susceptíveis à degradação, com exceção do Sudan I, mas este co-elui com dihidroxilados e oxicarotenóides na maioria dos sistemas utilizados.

Qualquer que seja o método de quantificação de carotenóides por CLAE, o grande problema é obter e manter padrões puros, de modo a obter uma quantificação segura e rápida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem e Preparo de Amostra

Quatro tipos de alimentos, com características diferentes quanto à composição de carotenóides, foram selecionados para comparar e avaliar três procedimentos na determinação de pró-vitamina A. Foram escolhidos: couve cultivar Manteiga; cenoura cultivar Nantes; tomate cultivar Santa Cruz e mamão cultivar Solo. Todas as amostras foram obtidas em supermercados e feiras-livres da cidade de Campinas. Quatro lotes de cada alimento foram analisados em duplicata simultaneamente pelos três métodos.

Para couve partiu-se sempre de um maço finamente picado e misturado, e para cenoura e tomate de uma amostra de 1 kg homogeneizada. Para o mamão, após a retirada das sementes, foi utilizada a polpa homogeneizada das partes opostas resultantes do quarteamento longitudinal feito em dois frutos.

Para verificar a incidência de *cis* isômeros de algumas pró-vitaminas A, em alimentos "in natura" e processados, foram escolhidas 12 frutas, algumas com diferentes cultivares, e 11 hortaliças. Sete das hortaliças sofreram cozimento e duas foram refogadas, em condições semelhantes às utilizadas no preparo doméstico. Para cada amostra foram feitas cinco determinações em duplicata.

A maioria das frutas foram obtidas em supermercados e feiras-livres na região de Campinas, São Paulo. Manga cultivar Haden, mamão cultivar Solo, nectarina, nêspera, maracujá e pêssego cultivar Diamante foram produzidas no estado

de São Paulo. Acerola e pitanga foram apanhadas em quintais domésticos na cidade de Campinas. Manga cultivar Tommy Atkins e mamão cultivar Tailândia vieram do Mato Grosso do Sul e Bahia, respectivamente. Um tipo de pêssego veio do Chile. Abricó e cajá foram comprados no Maranhão e Rio Grande do Norte, respectivamente, e pequi e buriti no Piauí. As quatro últimas frutas, compradas em feiras-livres no estádio maduro, foram transportadas de avião e analisadas assim que chegaram ao laboratório.

No caso dos frutos grandes (mamão, manga, abricó), de cada lote formado por 3 a 5 frutos que foram quarteados, as partes opostas foram tomadas e após retirada das sementes e da casca, a polpa foi homogeneizada num liquidificador tipo "Waring". Para os frutos de tamanho médio (pêssego, nectarina, nêspera, pequi e buriti), as polpas de cada lote composto de 5 a 10 frutos foram homogeneizadas após a retirada das sementes e da casca. Cerca de 30 frutos foram utilizados para formar cada lote para as frutas pequenas (acerola, cajá, pitanga), cujas polpas foram homogeneizadas após a retirada das sementes. Para o maracujá, a polpa de 5 frutos foi colocada em liquidificador visando facilitar a retirada dos caroços.

Dependendo do conteúdo de carotenóides presente nas frutas, foram tomadas para análise de 5 a 100 g de amostra homogeneizada. Na TABELA 6 estão esquematizadas as amostragens realizada com as frutas.

As hortaliças foram compradas em supermercados e mercearias de Campinas, São Paulo. Nos casos de agrião, espinafre, brócolis e couve, para a tomada da amostra, partiu-se sempre de um maço finamente picado e homogeneizado. Para o giló, cenoura, pimentão, quiabo, vagem e milho (previamente debulhado) partiu-se sempre de um lote de 500 g inteiramente homogeneizado. Para abóbora foram utilizados 2 frutos, que após o quarteamento tiveram as partes opostas homogeneizadas.

TABELA 6: Amostragem de frutas para a determinação de *cis*-isômeros.

frutos	origem	quantidade de cada lote	quantidade de amostra submetida à análise (g)
.pequeno			
acerola	Campinas-SP		100
pitanga	Campinas-SP	30 frutos	50
cajá	Natal-RN		50
.médio			
nectarina	Limeira-SP		100
nêspera cv Mizuho	Limeira-SP		100
maracujá cv Mamão	Limeira-SP		50
pêssego chileno	Chile	5-10 frutos	100
pêssego cv Diamante	Jundiaí-SP		100
pequi	Teresina-PI		50
buriti	Teresina-PI		5
.grande			
manga cv Haden	Sumaré-SP		100
manga cv Tommy Atkins	Mato Grosso do sul-MS		100
mamão cv Solo	Jundiaí-SP	3-5 frutos	80
mamão cv Tailândia	Teixeira de Freitas-BA		80
abricó	São Luis-MA		80

cv-cultivar

Dependendo do conteúdo de carotenóides, foram tomadas para análise de 5 a 60 g de amostra.

Amostras de giló, espinafre, cenoura, brócolis, quiabo, vagem e abóbora sofreram cozimento, sendo que as duas últimas também foram refogadas em óleo. A amostragem nesse caso, também foi feita de modo semelhante à descrita para as mesmas hortaliças quando analisadas cruas. Um esquema da amostragem e das condições de processamento estão apresentados na TABELA 7.

Para a determinação da composição completa de carotenóides foram escolhidos o abricó, o buriti e o pequi, que são muito consumidos e apreciados pelas populações onde essas frutas ocorrem, assim como outras frutas brasileiras das quais não havia nenhum, ou poucos dados sobre a composição de carotenóides, como é o caso da nectarina, da nêspera e do pêssego. A obtenção das amostras seguiu os mesmos parâmetros já descritos anteriormente para essas frutas, sendo feitas para cada amostra cinco determinações, em duplicata.

Padrões de β -apo-8'-carotenal, β -criptoxantina e zeinoxantina, utilizados para a obtenção dos espectros de massa, foram cedidos pela Hoffmann-LaRoche & Co. (Basel-Switzerland).

4.2. Cuidados Necessários

Todas as precauções foram tomadas para se evitar a *cis*-isomerização e a degradação dos carotenóides durante a análise, de tal forma que as análises foram feitas o mais rápido possível, protegendo os pigmentos da luz e evitando-se as altas temperaturas. A adição de $MgCO_3$ para a neutralização dos ácidos,

TABELA 7: Amostragem e condições do preparo doméstico de hortaliças para a determinação de cis isômeros.

hortaliças	quantidade de cada lote	preparo doméstico	quantidade de amostra submetida à análise (g)
abóbora cv Menina Verde	2 frutos	cru	10
	2 frutos	cozido por 15'	10
	2 frutos	refogado em óleo por 10'	10
agrião	1 maço	cru	5
brócolis	1 maço	cru	5
	1 maço	cozido por 5'	5
cenoura cv Imperador	500 g	cru	10
	500 g	cru	10
	500 g	cozido por 10'	10
couve cv Manteiga	1 maço	cru	5
	1 maço	cru	5
espinafre	1 maço	cru	5
	1 maço	cozido por 5'	5
giló	500 g	cru	60
	500 g	cozido por 10'	60
milho	500 g	cru	60
pimentão verde	500 g	cru	30
	500 g	cru	30
	500 g	cru	30
quiabo	500 g	cru	60
	500 g	cozido por 5'	60
vagem cv Macarrão	500 g	cru	60
	500 g	cozido por 10'	60
	500 g	refogado em óleo por 10'	60

cv-cultivar

no sentido de evitar a isomerização dos carotenóides, se mostrou desnecessária.

4.3. Métodos para a Determinação do Valor de Vitamina A

Nas FIGURAS 3, 4 e 5 estão esquematizadas as três metodologias avaliadas.

No método recomendado pela COST91 (BRUBACHER et alii, 1985), as amostras foram analisadas seguindo-se o procedimento B, descrito para a determinação total de carotenos em frutas, hortaliças e materiais de origem vegetal inalterados. Embora o método de COST91 utilize coluna de AL_2O_3 , não há nenhuma intenção em separar as diferentes pró-vitaminas A, já que os autores consideram a contribuição das pró-vitaminas, além do β -caroteno, desprezível. A fração recolhida da coluna é assumida como β -caroteno, quantificada pela absorbância a 450 nm, utilizando o coeficiente de absorção de 2600 (éter de petróleo) ou 2590 (hexano).

Existem no método proposto por COST91 algumas etapas onde há um grande manuseio da amostra, como por exemplo para a retirada da água residual, onde se adiciona etanol e após evaporação o resíduo é dissolvido em hexano e novamente evaporado para a remoção de traços de etanol e finalmente redissolvido em hexano ou éter de petróleo.

Os métodos de IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA simplificado são semelhantes em várias etapas. A saponificação é realizada apenas em amostras contendo ésteres de pró-vitaminas A. A separação das diferentes pró-vitaminas é realizada em coluna de MgO:hiflosupercel, e a quantificação das frações isoladas feita

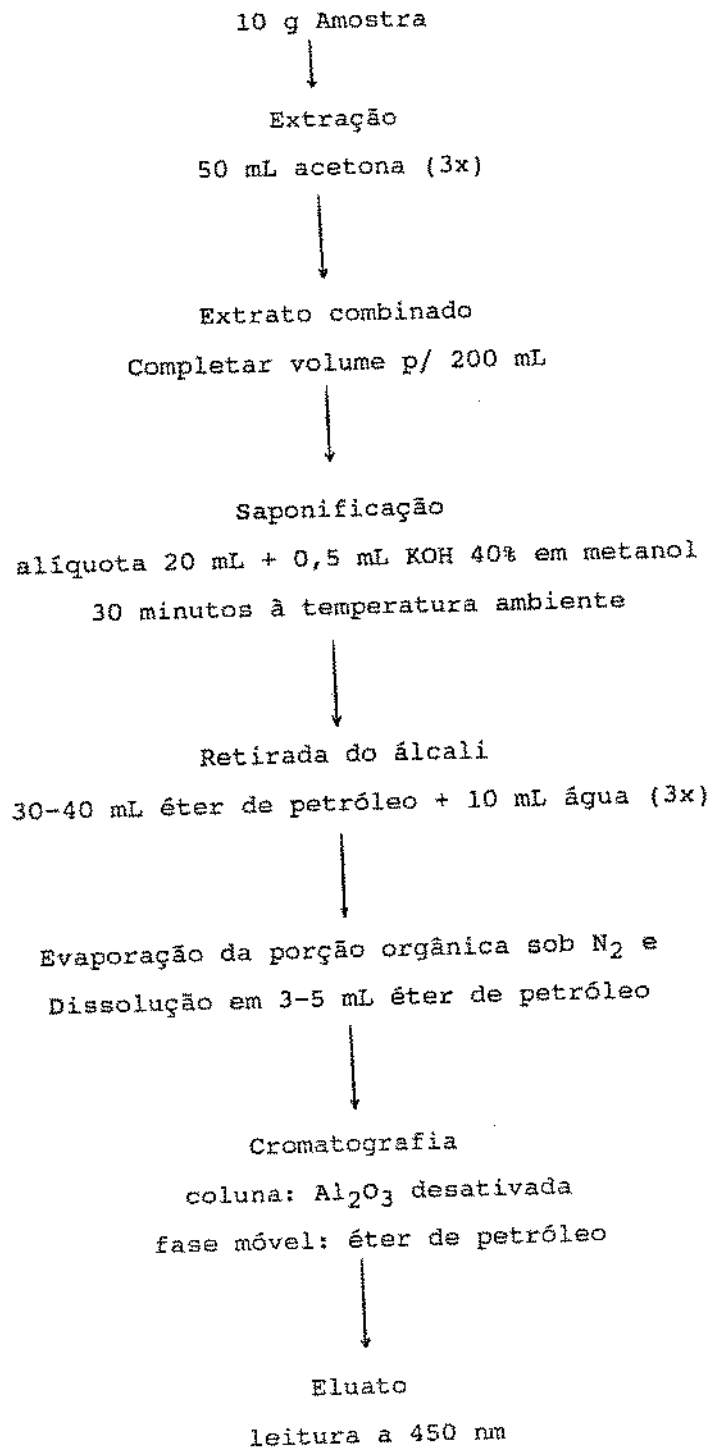


FIGURA 3: Esquema da metodologia recomendada por COST91.

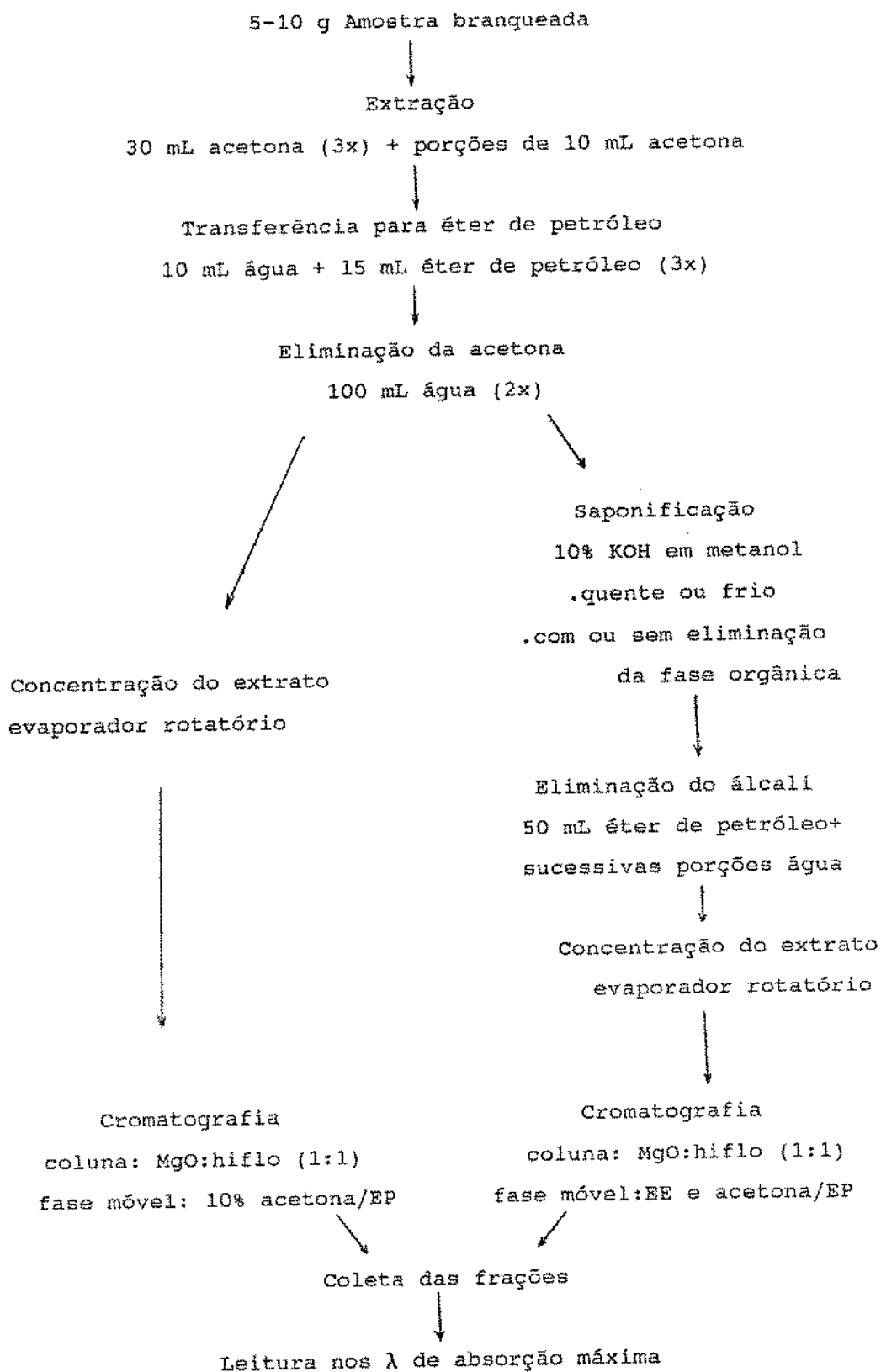


FIGURA 4: Esquema da metodologia recomendada pelo IVACC.

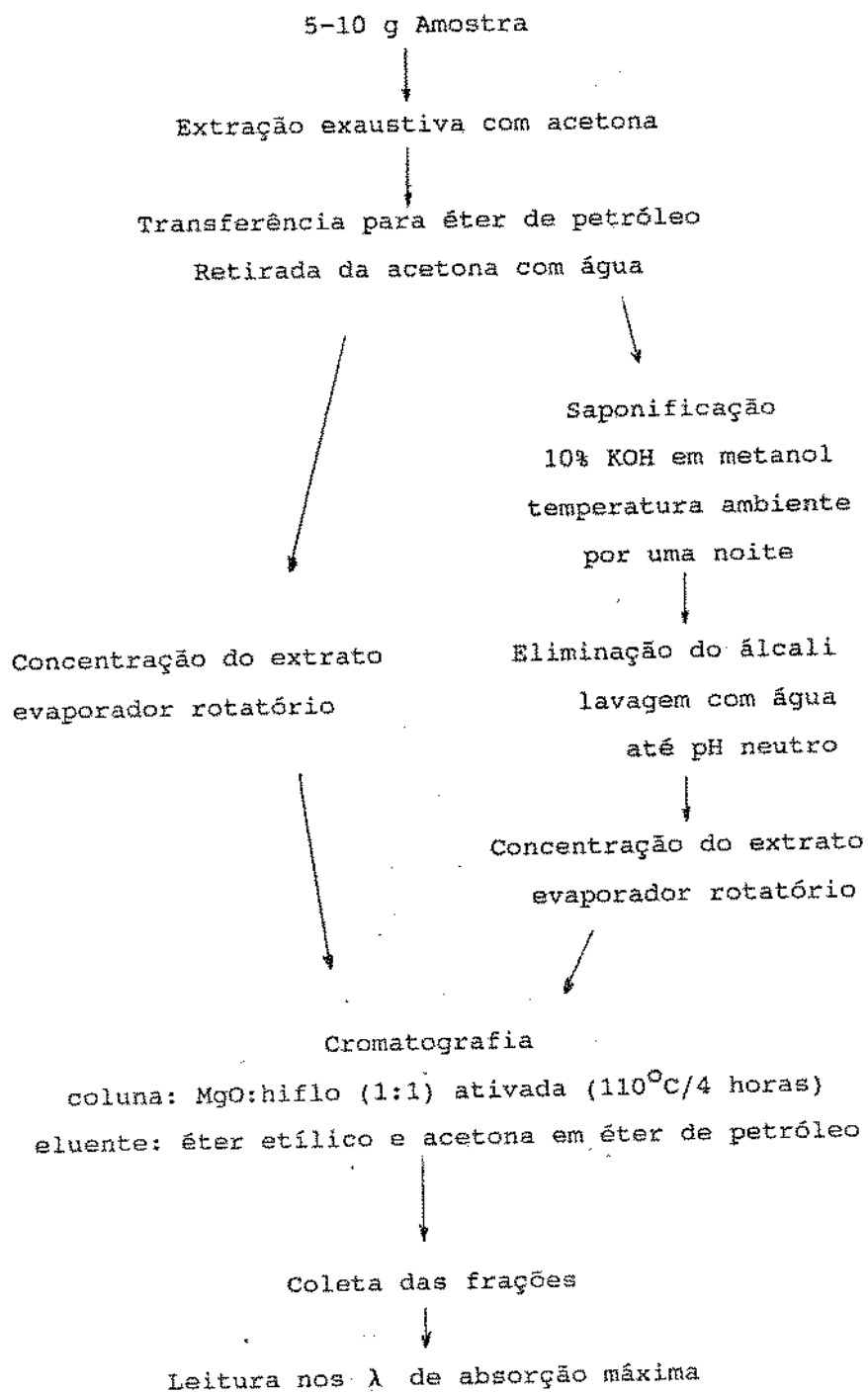


FIGURA 5: Esquema da metodologia de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* simplificada

através dos máximos de absorção, utilizando os coeficientes de absorção tabelados por DAVIES (1976), de acordo com a Lei de Beer.

O método recomendado pelo IVACG pede o branqueamento da amostra antes da extração. Como o método não especifica como isso deve ser feito, o branqueamento neste trabalho foi realizado mediante imersão durante 3 minutos em água em ebulição (RANGANATH & DUBASH, 1981). O método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) considera desnecessária a inativação das enzimas, desde que a extração se proceda imediatamente após a homogeneização da amostra.

No IVACG quatro tipos de saponificação são sugeridos, a frio ou a quente, com e sem evaporação da camada orgânica. As amostras não saponificadas são eluídas da coluna com 10% de acetona em éter de petróleo, enquanto que concentrações crescentes de éter etílico (1, 2 e 5%) e acetona (5 e 20%) em éter de petróleo são usadas para amostras saponificadas. No método descrito por RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) a saponificação é realizada à frio (temperatura ambiente) por uma noite.

No método recomendado pelo IVACG como a identificação dos pigmentos não é especificada, presume-se que seja pela ordem de eluição na coluna e pelo espectro de absorção. Já no método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988), a identificação é feita, além do comportamento na coluna, através dos máximos de absorção registrados na faixa de comprimento de onda de 300 a 550 nm, pelo comportamento na camada delgada de sílica gel e por respostas a reações químicas específicas.

Pelo método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988), pode-se conseguir a separação e quantificação de todas as pró-vitaminas, mesmo aquelas presentes em pequenas quantidades (limite de detecção de 0,04 µg/g), ressaltando-se no entanto, que neste caso o método torna-se mais longo e complicado.

Para analisar os dados estatisticamente, foi feita a análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey.

4.4. Determinação dos Coeficientes de Absorção

Trans- α -caroteno e *trans- β -caroteno* foram cedidos pela Hoffmann-LaRoche (Basel, Switzerland). *Trans- β -criptoxantina* e *trans-licopeno* foram isolados de mamão. *13-Cis- β -caroteno* e *9-cis- β -caroteno* foram isolados de couve e agrião e a *neo- β -criptoxantina* de pêssego e nectarina. Um novo pigmento identificado no abricó também teve seu coeficiente de absorção determinado.

Os isômeros foram obtidos das frações conseguidas pelo método descrito por RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988), recromatografadas em coluna de Ca(OH)_2 . As frações isoladas na coluna de Ca(OH)_2 foram submetidas à cromatografia de camada delgada de sílica gel, desenvolvida com 5% de éter etílico em éter de petróleo para os isômeros do α -caroteno, β -caroteno e licopeno, e 50% de éter etílico em éter de petróleo para os isômeros da β -criptoxantina e para o β -apo-8'-carotenol. Após o desenvolvimento só o centro das manchas foi retirado e os pigmentos extraídos com éter de petróleo. A purificação foi finalizada em uma pipeta "Pasteur" empacotada com Al_2O_3 desenvolvida com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo.

Os pigmentos purificados, após evaporação do solvente sob atmosfera de N_2 , foram imediatamente pesados (10 a 20 μg) numa balança analítica de alta sensibilidade, marca Perkin-Elmer modelo AD-6 (precisão de $\pm 0,0001$ mg), e dissolvidos

em solventes de grau analítico, utilizando para isso um agitador de ultrassom. O espectro de absorção foi registrado num espectrofotômetro marca Perkin-Elmer modelo Lambda 6, numa faixa de comprimento de onda de 300 a 550 nm. Os coeficientes de absorção ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) foram calculados de acordo com a Lei de Beer (DAVIES, 1976).

Para cada pigmento dissolvido em cada um dos solventes foram feitas em média 20 determinações. Para a rejeição de alguns poucos resultados foi aplicado o teste "Q" (DEAN & DIXON, 1951).

4.5. Determinação dos Isômeros de Pró-vitaminas A

As etapas desde a extração até a separação individual das pró-vitaminas em coluna de MgO:hiflosuperpel (1:2) seguiram o método descrito por RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988). As frações pró-vitâmicas obtidas foram recromatografadas em coluna (1,2 cm de diâmetro interno por 8 cm de altura) de Ca(OH)₂ para a separação dos isômeros (BICKOFF *et alii*, 1949 e SWEENEY & MARSH, 1970).

Para os isômeros do β -caroteno a coluna de Ca(OH)₂ foi desenvolvida apenas com éter de petróleo. 13-*Cis*- β -caroteno e *trans*- β -caroteno foram eluídos com éter de petróleo e o 9-*cis*- β -caroteno com 5% de éter etílico em éter de petróleo. Para os isômeros da β -criptoxantina utilizou-se como eluente 10% de acetona em éter de petróleo.

A identificação dos carotenóides foi feita como descrito anteriormente em detalhes por RODRIGUEZ *et alii* (1976). Isto envolve os espectros de absorção, o comportamento

cromatográfico na coluna e na camada delgada e reações químicas específicas (LIAAEN-JENSEN, 1971). Uma propriedade dos isômeros que também foi utilizada para auxiliar na identificação, foi a chamada "razão Q" (absorção no λ máx./ absorção no pico cis) (VETTER *et alii*, 1971).

A quantificação das pró-vitaminas isoladas foi feita espectrofotometricamente como descrito por DAVIES (1976), utilizando os coeficientes de absorção determinados neste trabalho.

4.6. Confirmação da Presença de Cis-isômeros por CLAE

Para verificar a incidência de isômeros por CLAE utilizou-se um cromatógrafo líquido VARIAN modelo 5010, constituído de um sistema de bombeamento de solvente ternário, com válvula injetora tipo "rheodyne" e uma alça de amostragem de 10 μ l de capacidade. Foram utilizados dois detetores, o UV-visível Varian modelo 5100 e o de arranjo de diodos da Waters modelo 994, ambos com lâmpada de deutério, que operaram a 450 nm, acoplado a um integrador-registrador Varian modelo 4400.

A separação cromatográfica foi feita em coluna de 250x4.6 i.d. mm C18 (5 μ m), marca Vydac 201-TP54 (Vydac Separation Group, Hesperia, CA), protegida por uma coluna de guarda de 30x4.6 i.d. mm C18 (10 μ m), marca Micropore MCH-120 (Varian).

A extração e saponificação das amostras foram realizadas segundo RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988). As amostras foram dissolvidas em hexana e injetadas diretamente no cromatógrafo. Para uma demonstração mais nítida da presença ou

não de formas isoméricas das pró-vitaminas, estas foram isoladas em coluna de MgO:hiflosuperpel (RODRIGUEZ-AMAYA et alii, 1988) e as frações injetadas individualmente. Operou-se sempre de modo isocrático utilizando metanol:água (98:2) como fase móvel, com fluxo de 1,5 mL/min.

Os solventes empregados, marca Lichrosolv (Merck), foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo, empregando membrana tipo HVLP de 0,45 µm e a seguir degaseificado em ultrassom. A água utilizada foi obtida através do sistema de filtração Milli-Q. As amostras (ou padrões) foram filtrados em membrana FHLT, também de 0,45 µm (Millipore).

As formas *cis* e *trans* das pró-vitaminas foram localizadas por co-cromatografia com isômeros isolados, conforme descrito anteriormente para a determinação dos coeficientes de absorção, e com aqueles produzidos pela isomerização catalizada pelo iodo.

4.7. Cálculo do Valor de Vitamina A

A razão de conversão de 6 µg de β-caroteno correspondendo a 1 RE (retinol equivalente) estabelecida pelo NAS-NRC (1980) foi utilizada para calcular os valores de vitamina A, assim como foi levado em consideração os valores de biopotência de cada isômero (13% para 13-*cis*-α-caroteno, 50% para *trans*-α-caroteno, 53% para 13-*cis*-β-caroteno, 100% para *trans*-β-caroteno, 38% para 9-*cis*-β-caroteno, 30% para *trans*-α-criptoxantina, 42% para neo-β-criptoxantina, 57% para β-criptoxantina, 100% para *trans*-β-apo-10'-carotenal) (DEUEL et

alii, 1944, 1945, 1946; ZECHMEISTER, 1962; BAUERNFEIND, 1971, 1972).

4.8. Determinação Completa de Carotenóides

4.8.1. Triagem

Para a realização da triagem da composição de carotenóides, útil na verificação da complexidade das amostras e visando facilitar a otimização das condições de operação, tanto em cromatografia de coluna aberta como em CLAE, aplicou-se a técnica desenvolvida por BRITTON (1985). Foram utilizadas pequenas placas prontas (4 x 10 cm) de sílica gel em alumínio (TLC e HPTLC), desenvolvidas em béquers de 100 mL como cuba cromatográfica, utilizando 10 mL de cada fase móvel.

Tanto as placas de TLC como as de HPTLC foram desenvolvidas com os mesmos sistemas de solventes. Após a aplicação da amostra, o primeiro desenvolvimento foi realizado em 10% de éter etílico em éter de petróleo, que possui a capacidade de separar os carotenos entre si. Após verificar o número de carotenos presentes nas amostras, a mesma placa foi colocada em outro béquer com 70% de éter etílico em éter de petróleo, que provoca a separação entre os mono-hidroxilados e possibilita também verificar a presença de apo-carotenais. A seguir a mesma placa foi desenvolvida com 5% de etanol em éter de petróleo, que separa os di- e tri-hidroxilados. Para evidenciar a presença de epóxidos a placa foi exposta a vapores de HCl.

4.8.2. Método por cromatografia de coluna aberta

A metodologia seguida foi a descrita por RODRIGUEZ et alii (1976). As etapas de extração e saponificação dos carotenóides foram realizadas da mesma forma já descrita anteriormente no método simplificado de RODRIGUEZ-AMAYA et alii (1988) para a determinação de pró-vitaminas A. Em amostras onde a concentração de óleo era muito alta, como por exemplo no buriti e piqui que são frutos de palmáceas, a saponificação foi realizada de forma mais drástica, utilizando para tanto uma solução de KOH 40% em metanol, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

Após eliminação do álcali, através de lavagem com água, o extrato foi diluído a volume inicial e uma alíquota tomada para a realização da triagem da composição de carotenóides. A outra parte do extrato foi concentrada e se procedeu a separação dos carotenóides.

Uma coluna de vidro (2 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura) foi empacotada a vácuo com uma mistura de MgO e hiflosupercel (1:2) até a altura de 12 cm, após empacotamento. Sulfato de sódio anidro foi colocado no topo da coluna para reter a água que ainda estivesse presente na amostra. Mantendo-se o vácuo, o extrato foi aplicado e as primeiras frações foram eluídas com concentrações crescentes de éter etílico e acetona em éter de petróleo, e os carotenóides mais polares foram eluídos com acetona pura e acetona:água (9:1). No caso específico do abricó a coluna de MgO:hiflosupercel não se mostrou eficiente na separação dos pigmentos, sendo utilizada uma coluna de Al₂O₃ neutro (atividade II-III), desenvolvida com o mesmo sistema de solventes.

As frações contendo acetona foram lavadas com água destilada, sendo adicionado a seguir Na₂SO₄ anidro para a eliminação da água residual. As frações isoladas foram

concentradas ou diluídas a volume adequado para leitura no espectrofotômetro.

As frações que mostraram ser misturas, quando cromatografadas em camada delgada, foram recromatografadas em coluna de Al_2O_3 neutro, desenvolvida com os mesmos eluentes.

Para a separação das formas isoméricas das frações seguiu-se o procedimento descrito por BICKOFF et alii (1949), descrito em detalhes no item 4.5.

A identificação dos carotenóides foi feita analisando-se um conjunto de parâmetros, tais como: ordem de eluição na coluna, espectros de absorção na região do visível, valores de R_f na camada delgada e reações químicas específicas. No caso de carotenóides ainda não relatados na literatura e com vistas a uma confirmação mais definitiva de outros, somou-se aos parâmetros acima citados, dados obtidos por espectrometria de massa (EM).

Os espectros de absorção foram registrados na faixa de comprimento de onda de 300 a 550 nm, utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe (Perkin Elmer modelo Lambda 6). Os máximos de absorção foram comparados com os valores tabelados por DAVIES (1976).

Para a determinação dos valores de R_f , as frações de carotenóides isoladas foram concentradas e cromatografadas em camada delgada de sílica gel (0,25 mm de espessura) ativada por 1 hora a $110^\circ C$, utilizando como fase móvel 3% de metanol em benzeno. Nessas condições os carotenos eluem com a frente do solvente e as xantofilas ficam mais ou menos retidas de acordo com o número e tipo de grupos funcionais.

Após desenvolvimento, a placa foi exposta a vapores de HCl para verificar a presença de epóxidos, evidenciada pela mudança na coloração de amarelo ou laranja para azul ou verde. O tipo e o número de grupos epóxidos foram confirmados pela adição de HCl 0,1N à solução etanólica do pigmento. A

presença de 1 ou 2 grupos 5,6-epóxido é confirmada pela diminuição de 20 e 40 nm, respectivamente, dos máximos de absorção devido à transformação do 5,6-epóxido em 5,8-epóxido.

A configuração *cis* ou *trans* foi determinada através da adição de algumas gotas de uma solução etérea de iodo ao pigmento em éter de petróleo. O espectro registrado após cinco minutos de exposição à luz, demonstra no caso de carotenóide originariamente *trans* um deslocamento hipsocrômico, devido a isomerização para a forma *cis*. Para os originariamente *cis*-carotenóides ocorreu o inverso.

A reação de acetilação é útil para constatar a presença de hidroxilas. Esta técnica consiste em juntar 0,2 mL de anidrido acético ao pigmento dissolvido em 2,0 mL de piridina e deixar a mistura por 21 horas no escuro à temperatura ambiente. O pigmento é então transferido para éter de petróleo e submetido novamente à cromatografia em camada delgada. A reação é considerada positiva quando ocorre um aumento no valor de Rf.

As hidroxilas podem ser alílicas ou não, e esta posição é confirmada através da reação de metilação. Ao pigmento dissolvido em metanol, adiciona-se gotas de HCl 2N e após 3 horas no escuro à temperatura ambiente o pigmento é transferido para o éter de petróleo e recromatografado em camada delgada. A reação positiva caracteriza-se por um aumento do valor de Rf.

Finalmente, a presença de grupos carbonilas conjugadas é verificada por redução com NaBH_4 . O espectro desses carotenóides é caracterizado por um único pico alargado. Para a redução, alguns cristais de NaBH_4 são adicionados ao pigmento previamente dissolvido em etanol 95%. Após 3 horas no refrigerador, o espectro é novamente registrado. A transformação de um único máximo em três máximos reflete a conversão de um cetocarotenóide em xantofila.

O espectrômetro de massa utilizado para a confirmação da identificação foi de impacto eletrônico, modelo VG

Micromass 70/70 F, operando com uma energia de ionização de 70 eV e temperatura de ionização de 200-220^o C.

A quantificação foi feita a partir da absorbância máxima, aplicando-se a Lei de Beer, utilizando os valores de absorptividade tabelados por DAVIES (1976) e os determinados neste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desempenho de Três Métodos para a Determinação de Pró-Vitaminas A

Na TABELA 8 estão apresentados os teores de carotenóides de tomate, couve e cenoura obtidos por três metodologias.

O método de COST91, resultou sempre em teores de carotenos mais baixos. Uma das falhas observadas foi primeiramente o volume fixo de solvente para a extração, não considerando a natureza da amostra.

Para minimizar este problema foi realizada a extração exaustiva, isto é extração e filtração feita repetidamente (em média 3 vezes) até que o resíduo se tornou incolor, seguida do método original (COST91-modificado). Em alimentos onde a composição de carotenóides pró-vitamínicos e a própria matriz do alimento permitiu uma extração rápida, como no caso do tomate, o teor de caroteno aumentou em apenas 2% com a extração exaustiva. No entanto, para couve e cenoura o valor aumentou em 24% e 50%, respectivamente. Ainda assim os teores obtidos pelo COST91-modificado, continuaram os mais baixos, indicando dessa forma a existência de outra etapa crítica, provavelmente a saponificação. Esta etapa pode provocar a formação de artefatos (epóxidos e isômeros *cis*) e perdas quantitativas, principalmente das xantofilas, dependendo das condições utilizadas (KIMURA et alii, 1990).

Embora a saponificação fosse realizada a frio e por um período de tempo curto (30 minutos) no método de COST91, a

TABELA 8: Teores de pró-vitamina A ($\mu\text{g/g}$) em tomate, couve e cenoura determinados pelos três métodos.

amostra/pró-vitamina	COST91	COST91*	IVACG	IVACG*	ROD-AMAYA
Tomate					
amostra 1			4,5	4,4	4,5
β -caroteno	3,4	3,9	0,4	0,5	0,9
γ -caroteno					
amostra 2			4,0	4,2	4,5
β -caroteno	3,8	3,9	0,5	0,7	1,2
γ -caroteno					
amostra 3			4,7	4,7	4,6
β -caroteno	4,1	4,5	0,6	1,0	1,4
γ -caroteno					
amostra 4			4,6	4,4	4,4
β -caroteno	3,1	3,4	0,3	0,8	1,0
γ -caroteno					
média dp			4,5 \pm 0,3a	4,4 \pm 0,2a	4,4 \pm 0,1a
β -caroteno	3,6 \pm 0,4	3,9 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1b	0,8 \pm 0,2a	1,1 \pm 0,2a
γ -caroteno					
Couve					
amostra 1			26,8	35,7	36,2
β -caroteno	23,4	29,7			
amostra 2			22,1	31,0	33,6
β -caroteno	18,2	23,8			
amostra 3			25,5	32,4	35,3
β -caroteno	21,3	25,3			
amostra 4			23,8	33,8	37,1
β -caroteno	22,6	27,1			
média dp			24,6 \pm 2,0b	33,2 \pm 2,1a	35,5 \pm 1,5a
β -caroteno	21,4 \pm 2,3b	26,5 \pm 2,5b			
Cenoura					
amostra 1			13,3	14,2	14,5
α -caroteno	34,2	55,4	38,4	52,8	54,2
β -caroteno					
amostra 2			8,9	11,7	12,0
α -caroteno	29,1	48,2	35,7	46,7	49,6
β -caroteno					
amostra 3			11,9	13,2	12,9
α -caroteno	42,8	62,6	33,2	47,4	52,9
β -caroteno					
amostra 4			12,5	14,7	14,3
α -caroteno	37,6	51,9	40,1	51,5	56,7
β -caroteno					
média dp			11,7 \pm 1,9a	13,5 \pm 1,3a	13,4 \pm 1,2a
α -caroteno	36,0 \pm 5,8	54,5 \pm 6,1	36,9 \pm 3,1b	49,6 \pm 3,0a	53,8 \pm 2,9a
β -caroteno					

COST91* e IVACG* - modificado com extração exaustiva.
 A mesma letra, na mesma linha, significa que não há diferença significativa ($P \leq 0,05$)

concentração de KOH utilizada (40%) é muito alta, podendo levar dessa forma à degradação dos carotenóides. TAYLOR *et alii* (1987), verificando os efeitos da saponificação com a utilização de diferentes concentrações de KOH em metanol (6 a 30%), constataram que quanto maior a concentração do álcali maiores são as perdas de carotenóides. Além do problema da saponificação, o volume de água para a retirada do álcali especificado pelo COST91 não foi suficiente, pois após a lavagem, o pH da solução variava entre 9 a 10. A presença de álcali residual não permite uma boa separação dos carotenos na coluna.

Os métodos recomendados pelo IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) são mais versáteis que o de COST91, pois permitem a separação dos diferentes carotenóides. No entanto, os volumes dos solventes para a eluição das frações devem ser ajustados à natureza da amostra, e não fixados como no método de IVACG.

Tanto no método recomendado pelo IVACG como no de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) a quantidade de amostra tomada para a extração mostrou-se adequada à quantidade de carotenóides presentes. No IVACG, embora o branqueamento facilite a extração, pois permite uma maior penetração do solvente, o volume fixo do solvente extratante e a não repetição da trituração da amostra, não permitiram uma extração completa para couve e cenoura. Após extração exaustiva (IVACG-modificado), o teor de carotenóides aumentou em 34% e 30%, respectivamente.

Por último, pode-se observar que o método de COST91, além de apresentar os menores valores, é o que apresenta os maiores desvios padrão, provavelmente em decorrência da maior manipulação da amostra, como ocorre por exemplo durante a retirada da água residual.

Os resultados dos quatro procedimentos de saponificação sugeridos pelo método de IVACG, testados em mamão, estão apresentados na TABELA 9. Para o β -caroteno não houve diferença significativa, ao nível de 5%, entre os quatro

TABELA 9: Teores de pró- vitaminas A de mamão obtidos com os diferentes procedimentos de saponificação, sugeridos pelo método de IVACG.

pró- vitamina A	concentração (µg/g)			
	I	II	III	IV
amostra 1				
β-caroteno	1,9	2,0	1,8	1,7
β-criptoxantina	8,2	8,3	7,3	7,1
5,6-epoxi-β-criptoxantina	0,0	0,0	0,7	0,6
amostra 2				
β-caroteno	2,4	2,3	2,1	2,0
β-criptoxantina	9,3	9,1	8,4	8,2
5,6-epoxi-β-criptoxantina	0,0	0,0	0,5	0,0
amostra 3				
β-caroteno	2,3	2,0	1,8	1,8
β-criptoxantina	7,8	7,2	6,9	7,1
5,6-epoxi-β-criptoxantina	0,0	0,0	0,4	0,5
amostra 4				
β-caroteno	2,0	1,7	1,7	1,6
β-criptoxantina	8,8	8,5	7,2	7,0
5,6-epoxi-β-criptoxantina	0,0	0,0	1,1	0,9
média ± dp				
β-caroteno	2,2 ± 0,2a	2,0 ± 0,2a	1,9 ± 0,2a	1,8 ± 0,2a
β-criptoxantina	8,6 ± 0,7a	8,3 ± 0,9a	7,5 ± 0,7b	7,4 ± 0,6b
5,6-epoxi-β-criptoxantina	0,0 ± 0,0b	0,0 ± 0,0b	0,7 ± 0,3a	0,6 ± 0,3a

I - saponificação a frio

II - saponificação a frio com evaporação da fase orgânica

III - saponificação a quente

IV - saponificação a quente com evaporação da fase orgânica

A mesma letra, na mesma linha, significa que não há diferença significativa (P<0,05)

procedimentos. Já para a β -criptoxantina os dois procedimentos à quente resultaram em valores significativamente mais baixos, levando inclusive à formação de epóxidos da β -criptoxantina. Os resultados confirmaram as observações feitas anteriormente por KIMURA *et alii* (1990), que recomendam a saponificação a frio.

A TABELA 10 apresenta os teores de pró-vitamina A para mamão, determinados pelos três métodos. Mesmo utilizando o método de COST91-modificado, os teores de caroteno foram significativamente inferiores aos obtidos pelos dois outros métodos. Além disso, este método não determina a β -criptoxantina, que é o principal pigmento pró-vitamínico (KIMURA *et alii*, 1991).

Para a comparação escolheu-se os melhores dados obtidos pelo IVACG, resultantes da saponificação a frio. Assim os métodos de IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA simplificado apresentaram o mesmo desempenho.

A FIGURA 6 mostra comparativamente os valores de vitamina A, obtidos pelas três metodologias, para os diferentes tipos de alimentos e a FIGURA 7 os valores de vitamina A quando se realizou extração exaustiva das amostras nos métodos de COST91 e IVACG.

O método de COST91 apresenta dois problemas inerentes. O valor de vitamina A pode ser superestimado, já que não há a separação entre α -caroteno (pró-vitamina com 50% de atividade) e β -caroteno (pró-vitamina com 100% de atividade). Isso pode ser observado em cenoura onde, mesmo com teores mais baixos de carotenos, não houve diferença significativa no valor de vitamina A (FIGURA 7). Por outro lado, pode ocorrer subestimação do valor vitamínico, pois o método não leva em consideração a contribuição de xantofilas com atividade pró-vitamínica. No caso de mamão, por exemplo, a exclusão da β -criptoxantina resultou em subestimação do valor de vitamina A de aproximadamente 75%.

O método de IVACG apresentou valores de vitamina A significativamente menores que o método de RODRIGUEZ-AMAYA *et*

TABELA 10: Teores de pró-vitamina A ($\mu\text{g/g}$) determinados em mamão pelos três métodos.

amostra/pró-vitamina	COST91	COST91*	IVACG ¹	IVACG*	ROD-AMAYA
amostra 1					
β -caroteno	1,5	1,6	2,2	2,3	2,4
β -criptoxantina	-	-	8,2	8,4	9,0
amostra 2					
β -caroteno	2,2	2,3	2,8	2,6	3,1
β -criptoxantina	-	-	9,3	9,2	9,2
amostra 3					
β -caroteno	1,3	1,7	2,3	2,5	2,6
β -criptoxantina	-	-	7,8	8,1	8,8
amostra 4					
β -caroteno	1,9	2,1	2,2	2,2	2,5
β -criptoxantina	-	-	8,8	8,6	8,8
média \pm dp					
β -caroteno	$1,7 \pm 0,4b$	$1,9 \pm 0,3b$	$2,4 \pm 0,3a$	$2,4 \pm 0,2a$	$2,7 \pm 0,3a$
β -criptoxantina	-	-	$8,6 \pm 0,6a$	$8,6 \pm 0,5a$	$9,0 \pm 0,2a$

COST91* e IVACG* - modificado com extração exaustiva

¹ melhores dados, resultados da saponificação a frio

Letras iguais, na mesma linha, significa que não há diferença significativa ($P \leq 0,05$)

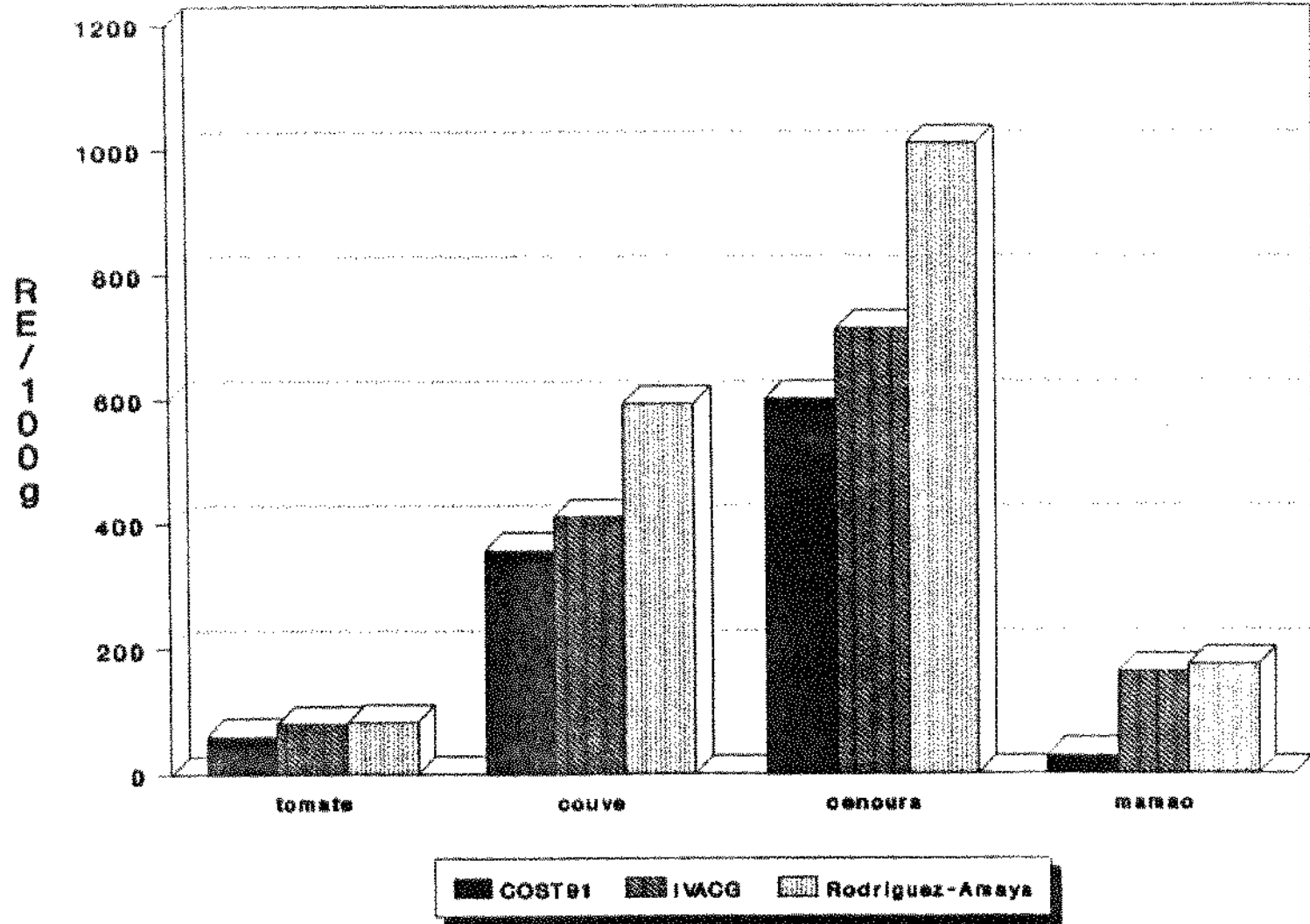


FIGURA 5: Valores de equivalentes de retinol obtido pelos métodos de COST91, IVACG e RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado.

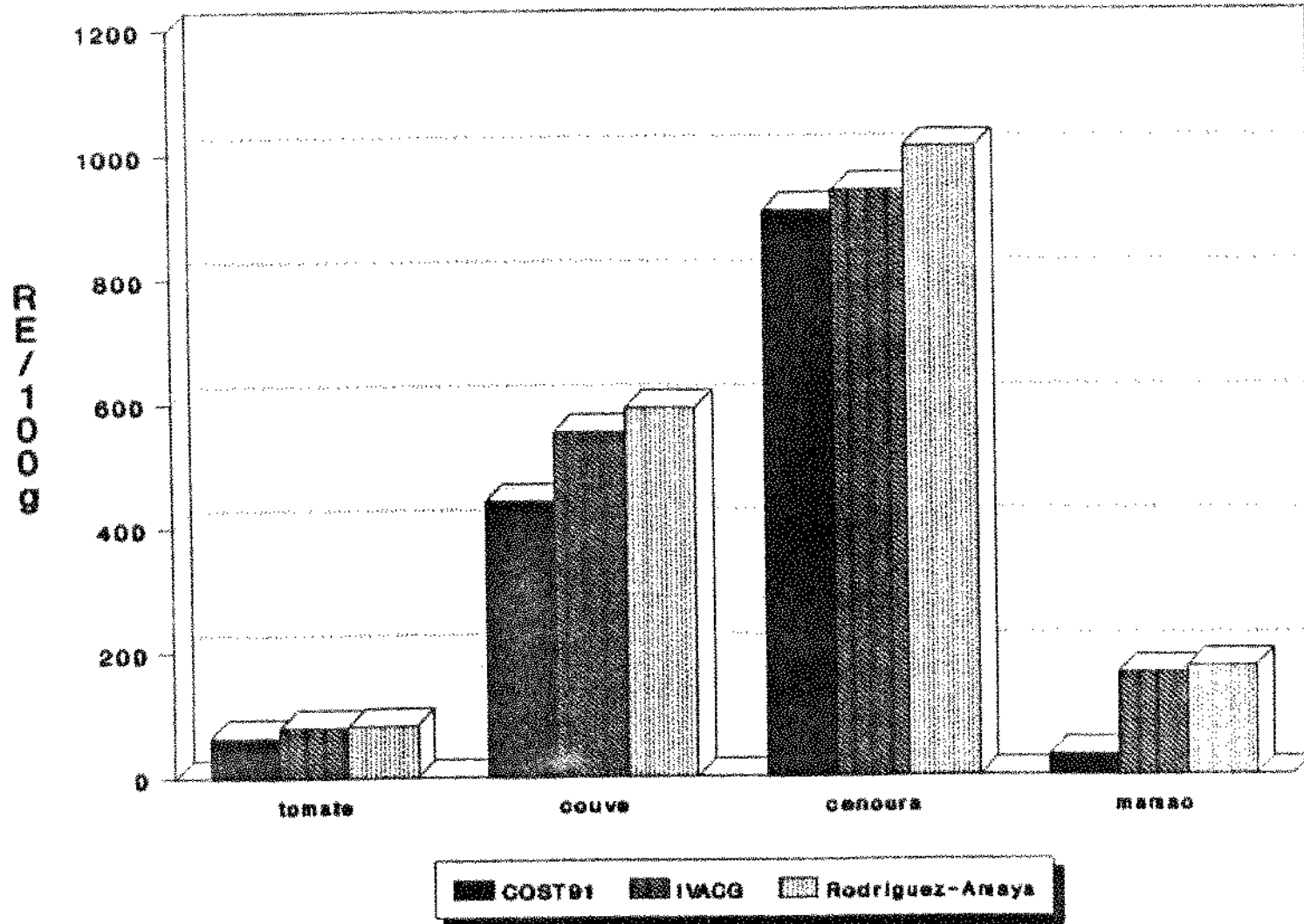


FIGURA 7: Valores de equivalentes de retinol obtido pelos métodos de COST91-modificado, IVACG-modificado e RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado.

alii (1988) em couve e cenoura. No entanto, após extração exaustiva (IVACG-modificado) os dois métodos tiveram estatisticamente a mesma performance.

5.2. Coeficientes de Absorção ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de Alguns Carotenóides em Solventes Comuns

A quantificação dos carotenóides, quer sua separação seja realizada por cromatografia de coluna aberta ou por CLAE, sempre é feita espectrofotometricamente. Assim, a precisão dos resultados depende dos valores dos coeficientes de absorção utilizados no cálculo das concentrações.

A TABELA 11 permite observar algumas discrepâncias nos valores dos coeficientes de absorção tabelados, no mesmo solvente. Nossos resultados, no entanto, mostraram-se coerentes com a maioria dos valores reportados. Isso representou uma grande confiabilidade na técnica empregada.

Os coeficientes de absorção dos isômeros das pró-vitaminas A não são conhecidos, exceto para o 13-*cis*- e 9-*cis*- β -caroteno determinados em éter de petróleo com 1,5% e 0,5% de *p*-metilanol, respectivamente (SWEENEY & MARSH, 1970). Como o *p*-metilanol não é um solvente muito utilizado na análise de carotenóides, os valores dos coeficientes de absorção foram determinados em éter de petróleo, hexano e metanol, que são solventes mais comuns na análise de carotenóides, tanto em cromatografia de coluna aberta como em CLAE.

Os isômeros do β -caroteno foram identificados pelos máximos de absorção, pela ordem de eluição na coluna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e também pelos valores da chamada "razão Q" (TABELA 12).

TABELA 11: Valores dos coeficientes de absorção de alguns trans-carotenóides.

pigmento	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	λ (nm)	solvente	referência
α -caroteno	2730	446	hexano	ZSCHEILE <i>et alii</i> (1942)
	2800	445	hexano	GOODWIM (1955)
	2180	474	dissulfeto de carbono	GOODWIM (1955)
	2800	444	éter de petróleo	SCHWIETER <i>et alii</i> (1965)
	2770 \pm 60 ^a	444	éter de petróleo	obtido neste trabalho
β -caroteno	2580	450	hexano	ZSCHEILE <i>et alii</i> (1942)
	2505	451	hexano	GOODWIM (1955)
	2592	449	hexano	ISLER <i>et alii</i> (1965)
	2590	450	hexano	BRUBACHER <i>et alii</i> (1985)
	2540	450	metanol	CRAFT & SOARES (1992)
	2600	450	éter de petróleo	BRUBACHER <i>et alii</i> (1985)
	2592	453	éter de petróleo	SCHWIETER <i>et alii</i> (1965)
	2580 \pm 40 ^a	449	éter de petróleo	obtido neste trabalho
β -criptoxantina	2470	452	hexano	ZSCHEILE <i>et alii</i> (1942)
	2386	452	éter de petróleo	ISLER <i>et alii</i> (1957)
	2330 \pm 90 ^a	447	éter de petróleo	obtido neste trabalho
licopeno	3460	472	hexano	ZECHMEISTER <i>et alii</i> (1943)
	3370	487	benzeno	SURMATIS & OFNER (1963)
	3450	472	éter de petróleo	SCHWIETER <i>et alii</i> (1965)
	3420 \pm 60 ^a	470	éter de petróleo	obtido neste trabalho

^a os valores são média de 20 determinações.

TABELA 12: Valores da razão Q^a e máximos de absorção dos isômeros do β -caroteno.

isômero	razão Q	λ (nm)		solvente	referência
		λ máx	pico cis		
<i>trans</i>	18,3	449	337	éter de petróleo	obtido neste trabalho
13- <i>cis</i>	2,3	443	336		
9- <i>cis</i>	6,5	445	335		
<i>trans</i>	21,2	449	338	hexano	obtido neste trabalho
13- <i>cis</i>	2,6	444	337		
9- <i>cis</i>	5,7	445	337		
<i>trans</i>	15,3	451	339	metanol	obtido neste trabalho
13- <i>cis</i>	2,1	445	339		
9- <i>cis</i>	4,8	446	338		
<i>trans</i>	20,69	455	341	acetona	JENSEN <i>et alii</i> (1964) ^b
13- <i>cis</i>	2,16	448	341		
9- <i>cis</i>	9,40	450	341		
15- <i>cis</i>	1,65	452	341		
<i>trans</i>	> 12	453		metanol	QUACKENBUSH (1987) ^c
13- <i>cis</i>	2,30	444			
9- <i>cis</i>	8,50	448			
<i>trans</i>	17,4	450	337	hexano	TSUKIDA <i>et alii</i> (1981) ^d
13- <i>cis</i>	2,8	442	336		
9- <i>cis</i>	1,5	445	338		
15- <i>cis</i>	1,9	448	335		
<i>trans</i>	11,3	452	340	metanol	O'NEIL <i>et alii</i> (1991) ^e
13- <i>cis</i>	2,2	445	338		
9- <i>cis</i>	7,3	446	344		
15- <i>cis</i>	1,7	449	339		
<i>trans</i>	12,1	451	339	metanol	O'NEIL <i>et alii</i> (1991) ^e
13- <i>cis</i>	2,7	443	339		
9- <i>cis</i>	10,1	445	339		
15- <i>cis</i>	1,7	448	338		

^a razão Q - absorção no λ máx/ absorção no pico cis

^b separado em coluna Nucleosil C18 com acetona:água (88:12)

^c separado em coluna Vydac 201TPC18 com metanol por 5 minutos, seguido de metanol:clorofórmio (94:6)

^d separado em coluna de Ca(OH)₂

^e separado em coluna de Ca(OH)₂ com acetona:hexano (99,4:0,6)

A TABELA 13 apresenta os valores de $A_{1\text{cm}}^{1\%}$, nos três diferentes solventes, determinados para os isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina, e os de um novo pigmento, ainda não relatado, que foi identificado no abricó.

A determinação dos coeficientes de absorção não é uma tarefa fácil conforme mostram os desvios padrões observados nesse estudo, utilizando a microbalança, que estão apresentados nas TABELAS 11 e 13.

5.3. Ocorrência de Isômeros de Pró-vitaminas A

5.3.1. Em frutas

Considerando os resultados apresentados na TABELA 14, as diferentes frutas podem ser divididas em dois grandes grupos: (1) frutas que possuem o β -caroteno como pigmento pró-vitamínico majoritário, e (2) frutas onde a β -criptoxantina é a principal pró-vitamina. Abricó, acerola, buriti, manga, maracujá e nêspera, pertencem ao primeiro grupo. O conteúdo médio de β -caroteno variou entre 3,4 a 359,8 $\mu\text{g/g}$. O buriti é excepcionalmente rico em pró-vitamina A, seu conteúdo de β -caroteno é muito maior que o de qualquer outra fruta analisada. O segundo grupo é constituído de cajá, mamão, nectarina, pêssego, pequi e pitanga, apresentando um conteúdo de β -criptoxantina na faixa de 3,9 a 16,9 $\mu\text{g/g}$. O β -caroteno foi encontrado em todas as amostras analisadas, enquanto o α -caroteno apenas em buriti e em baixa concentração, ou traços em acerola e cajá. Embora o β -caroteno fosse o pigmento predominante em nêspera, quantidades

TABELA 13: Valores dos coeficientes de absorção^a dos isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina, e do β -apo-8'-carotenol.

pigmento	$A_{1\%}^{1\text{cm}}$	λ (nm)	solvente
13-cis- β -caroteno	1730 ± 30	443	éter de petróleo
	1760 ± 30	444	hexano
	1670 ± 40	445	metanol
	1930^b	444	1,5% p-metilanisol em éter de petróleo
9-cis- β -caroteno	2370 ± 60	445	éter de petróleo
	2390 ± 40	445	hexano
	2220 ± 30	446	metanol
	2360^b	449	0,5% p-metilanisol em éter de petróleo
neo- β -criptoxantina	2150 ± 120	445	éter de petróleo
	2180 ± 60	444	hexano
	2070 ± 20	445	metanol
β -apo-8'-carotenol	2050 ± 40	398	éter de petróleo
	1970 ± 50	398	hexano
	2030 ± 10	396	metanol

a média e desvio padrão de 20 determinações.

b dados tabelados por SWEENEY & MARSH (1970), para comparação.

Tabela 14: Concentração de cis- e trans-isômeros de pró-vitaminas A em frutas.

Frutas	nome científico	n ^o de lotes analisados ^a	pH	pró-vitamina A	concentração (µg/g)
Abriçó	<i>Nammea americana</i>	5	4.3-4.6	13-cis-β-caroteno	0,5 ± 0,1
				trans-β-caroteno	14,1 ± 4,1
				9-cis-β-caroteno	0,3 ± 0,2
				trans-β-zeacaroteno	0,8 ± 0,1
				trans-β-apo-10'-carotenal	5,0 ± 1,4
				trans-β-apo-8'-carotenol	11,1 ± 3,7
Acerola	<i>Malpighia glabra</i>	5	4.1-4.4	trans-α-caroteno	tr em 2 amostras
				trans-β-caroteno	3,4 ± 0,2
				trans-β-criptoxantina	0,4 ± 0,1
Buriti	<i>Mauritia vinifera</i>	5	nd	13-cis-α-caroteno	1,5 ± 1,4
				trans-α-caroteno	80,1 ± 9,0
				13-cis-β-caroteno	4,2 ± 2,4
				trans-β-caroteno	359,8 ± 32,5
				9-cis-β-caroteno	1,0 ± 0,5
				trans-β-zeacaroteno	5,4 ± 1,4
Cajá	<i>Spondias lutea</i>	5	3.9-4.4	trans-α-caroteno	0,3 ± 0,1
				trans-β-caroteno	1,4 ± 0,3
				neo-β-criptoxantina	tr em 2 amostras
				trans-β-criptoxantina	16,9 ± 2,2
Mamão cultivar Solo	<i>Carica papaya</i>	5	4.0-4.4	trans-β-caroteno	3,0 ± 0,4
				trans-β-criptoxantina	7,6 ± 0,8
				trans-γ-caroteno	tr em 3 amostras
cultivar Tailândia		5	4.0-4.2	trans-β-caroteno	2,6 ± 0,6
				trans-β-criptoxantina	10,2 ± 2,5
Manga cultivar Haden	<i>Mangifera indica</i>	5	4.1-4.4	13-cis-β-caroteno	tr em 3 amostras
				trans-β-caroteno	12,5 ± 4,4
				trans-α-criptoxantina	0,3 ± 0,1
cultivar Tommy Atkins		5	4.3-4.7	13-cis-β-caroteno	tr em 2 amostras
				trans-β-caroteno	15,5 ± 0,9
				trans-α-criptoxantina	0,4 ± 0,2

Maracujá	<i>Passiflora</i>	5	4.0-4.2	trans- β -caroteno	4,7 \pm 1,0
cultivar	<i>ligulares</i>				
Mamão					
Nectarina	<i>Prunus</i>	5	4.4-4.7	13-cis- β -caroteno	0,1 \pm 0,1
	<i>persica</i>			trans- β -caroteno	1,1 \pm 0,2
				9-cis- β -caroteno	0,1 \pm 0,1
				neo- β -criptoxantina	0,3 \pm 0,2
				trans- β -criptoxantina	3,9 \pm 0,7
Nêspera	<i>Eriobotrya</i>	5	4.1-4.3	13-cis- β -caroteno	tr em 3 amostras
cultivar	<i>japonica</i>			trans- β -caroteno	8,0 \pm 0,6
Mizuho				trans- β -criptoxantina	4,8 \pm 0,5
Pequi	<i>Cariocar</i>	5	nd	trans- β -caroteno	0,1 \pm 0,1
	<i>villosium</i>			13-cis- β -caroteno	tr em 2 amostras
				trans- β -caroteno	1,2 \pm 0,5
				neo- β -criptoxantina	0,4 \pm 0,2
				trans- β -criptoxantina	4,4 \pm 0,9
Pêssego	<i>Prunus</i>	5	4.2-4.4	13-cis- β -caroteno	0,2 \pm 0,1
Chileno	<i>persica</i>			trans- β -caroteno	1,2 \pm 0,2
				9-cis- β -caroteno	0,1 \pm 0,1
				neo- β -criptoxantina	0,3 \pm 0,1
				trans- β -criptoxantina	5,1 \pm 0,5
cultivar		5	4.1-4.3	13-cis- α -caroteno	0,2 \pm 0,1
Diamante				trans- β -caroteno	0,6 \pm 0,2
				9-cis- β -caroteno	0,1 \pm 0,1
				neo- β -criptoxantina	0,2 \pm 0,1
				trans- β -criptoxantina	4,1 \pm 0,3
Pitanga	<i>Eugenia</i>	5	4.0-4.1	trans- β -caroteno	3,7 \pm 0,6
	<i>uniflora</i>			trans- β -criptoxantina	12,3 \pm 1,1
				trans- γ -caroteno	0,4 \pm 0,1

^a cada lote foi analisado em duplicata

tr - traços

nd - não determinado (a natureza da fruta não permitiu a determinação do pH, como foi feito para as outras frutas).

apreciáveis de β -criptoxantina foram também observadas. Pequenas quantidades de α -criptoxantina apareceram nos cultivares de manga. γ -Caroteno foi detectado em buriti e pitanga e em traços em mamão cultivar Solo. No abricó foram encontradas quantidades apreciáveis de β -apo-10'-carotenol e β -apo-8'-carotenol.

Cis-isômeros das pró-vitaminas A, não foram encontrados em acerola, cajá, mamão cultivares Solo e Tailândia, maracujá e pitanga. Traços de 13-cis- β -caroteno foram observados em algumas amostras de mangas cultivares Haden e Tommy Atkins, nêspera e pequi. A média dos valores de vitamina A para as frutas mencionadas variou de 64 a 259 RE/100g (TABELA 15).

Cis-isômeros foram encontrados em níveis baixos em abricó (0,5 μ g/g de 13-cis- β -caroteno e 0,3 μ g/g de 9-cis- β -caroteno), nectarina (0,1 μ g/g de 13-cis- β -caroteno, 0,1 μ g/g de 9-cis- β -caroteno e 0,3 μ g/g de neo- β -criptoxantina), pêssego (0,2 μ g/g de 13-cis- β -caroteno, 0,1 μ g/g de 9-cis- β -caroteno e 0,3 μ g/g de neo- β -criptoxantina para o pêssego Chileno e 0,2 μ g/g de 13-cis- β -caroteno, 0,1 μ g/g de 9-cis- β -caroteno e 0,2 μ g/g de neo- β -criptoxantina para o pêssego cultivar Diamante) e pequi (0,4 μ g/g de neo- β -criptoxantina).

Os valores de vitamina A das frutas que continham cis-isômeros foram calculados com (45 a 6.489 RE/100g) e sem (47 a 6.992 RE/100g) a separação das formas isoméricas, mostrando uma superestimação de 3-10% quando os isômeros não foram separados (TABELA 15).

A recuperação obtida em nosso laboratório para o β -caroteno e β -criptoxantina em coluna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, utilizada para a separação de isômeros, foi de 96% e 94%, respectivamente. SWEENEY & MARSH (1970) encontraram o mesmo valor para o β -caroteno, utilizando coluna de $\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{Ca}(\text{OH})_2$ com a mesma finalidade. A isomerização na coluna não foi observada neste estudo, como também no de SWEENEY & MARSH. Se essas perdas, 4% para o β -caroteno e 6% para a β -criptoxantina forem consideradas, a superestimação do conteúdo em vitamina A em frutas "in natura"

TABELA 15: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros em frutas

Fruta/cultivar	valor de vitamina A (RE/100g) ¹					
	sem separação dos isômeros	com separação dos isômeros		% superestimação		
		a	b	a	b	
Abriçó	328	293	306	10	6	
Acerola	64	—	—	—	—	
Buriti	6992	6489	6769	7	3	
Cajá	191	—	—	—	—	
Namão						
Solo	122	—	—	—	—	
Tailândia	140	—	—	—	—	
Mangá						
Haden	209	—	—	—	—	
Tommy Atkins	259	—	—	—	—	
Maracujá	78	—	—	—	—	
Nectarina	47	45	47	4	0	
Nêspera						
Mizuho	179	—	—	—	—	
Pequi	57	54	56	5	2	
Pêssego						
chileno	75	73	75	3	0	
Diamante	58	55	57	5	2	
Pitanga	178	—	—	—	—	

¹ os valores são médias e desvio padrão de 5 lotes analisados individualmente.

a - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945).

b - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945), corrigido pela perda na coluna.

deixa de existir ou ocorre em valores muito mais baixos (2-6%) (TABELA 15). Portanto observa-se que, a separação de isômeros se mostra desnecessária para a determinação do valor de vitamina A em frutas frescas.

5.3.2. Em hortaliças

O exame dos trabalhos realizados com isômeros, demonstra que a forma cis ocorre mais em hortaliças do que em frutas, tendência confirmada pelos nossos resultados. Os cis-isômeros foram encontrados, em geral em baixas quantidades, em todas as hortaliças frescas analisadas exceto em cenoura (cultivar Imperador) e tomate (cultivares Santa Cruz e Marglobe) (TABELA 16). A faixa de concentração média foi de traços-3,4 µg/g para 13-cis-β-caroteno e traços-4,1 µg/g para 9-cis-β-caroteno. A média de trans-β-caroteno foi de 1,1 a 38,4 µg/g. Nas hortaliças verdes, como brócolis, giló, vagem, couve, espinafre e agrião, o 9-cis está presente em quantidade maior que o 13-cis-β-caroteno; já nas hortaliças não verdes verificou-se o inverso. Esse fato já havia sido observado por SWEENEY & MARSH (1970).

O α-caroteno foi encontrado em quantidades significativas em cenoura e abóbora, e em baixas concentrações em pimentão amarelo e vagem. Cenoura cultivar Imperador apresentou uma média de 19,0 µg/g de trans-α-caroteno e a cultivar Nantes 16,5 µg/g. Três dos cinco lotes de cenoura cultivar Nantes acusaram a presença de traços de 13-cis-α-caroteno. As amostras de abóbora cultivar Menina verde (estádio maduro) apresentaram uma média de 17,1 µg/g de trans-α-caroteno e os maiores teores de 13-cis-α-caroteno (0,3 µg/g).

Tabela 16: Concentração de cis- e trans-isômeros de pró- vitaminas A em hortaliças "in natura".

Hortaliças	nome científico	n ^o de lotes analisados ^a	pró- vitamina A	concentração (µg/g)
Abóbora Menina verde	<i>Cucurbita moschata</i>	5	13-cis-α-caroteno	0,3 ± 0,2
			trans-α-caroteno	17,1 ± 2,3
			9-cis-α-caroteno	0,1 ± 0,1
			13-cis-β-caroteno	0,2 ± 0,1
			trans-β-caroteno	23,6 ± 3,2
			9-cis-β-caroteno	0,3 ± 0,2
Agrião	<i>Nasturtium officinale</i>	5	13-cis-β-caroteno	1,8 ± 1,1
			trans-β-caroteno	23,3 ± 2,8
			9-cis-β-caroteno	2,2 ± 1,2
Brócolis	<i>Brassica oleracea</i>	4	13-cis-β-caroteno	1,2 ± 0,4
			trans-β-caroteno	18,1 ± 1,3
			9-cis-β-caroteno	1,5 ± 0,6
Cenoura Imperador	<i>Daucus carota</i>	5	trans-α-caroteno	19,0 ± 0,8
			trans-β-caroteno	38,4 ± 4,1
Nantes		5	13-cis-α-caroteno	tr em 3 amostras
			trans-α-caroteno	16,5 ± 2,3
			13-cis-β-caroteno	tr em 2 amostras
			trans-β-caroteno	33,0 ± 2,4
Couve	<i>Brassica oleracea</i>	5	13-cis-β-caroteno	3,4 ± 2,1
			trans-β-caroteno	25,8 ± 4,4
			9-cis-β-caroteno	4,1 ± 2,8
Espinafre	<i>Spinacea oleracea</i>	5	13-cis-β-caroteno	2,3 ± 1,2
			trans-β-caroteno	25,0 ± 4,4
			9-cis-β-caroteno	2,7 ± 0,8
Giló		5	13-cis-β-caroteno	tr em 2 amostras
			trans-β-caroteno	1,4 ± 0,4
			9-cis-β-caroteno	0,1 ± 0,1

Milho	<i>Zea mays</i>	5	13-cis- β -caroteno	0,4	\pm	0,2
			trans- β -caroteno	1,1	\pm	0,2
			9-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
			trans- β -criptoxantina	1,0	\pm	0,4
Pimentão verde	<i>Capsicum annuum</i>	4	13-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	2,1	\pm	0,4
			9-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,2
amarelo		4	trans- α -caroteno	0,5	\pm	0,2
			13-cis- β -caroteno	0,1	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	1,5	\pm	0,3
			9-cis- β -caroteno	0,3	\pm	0,2
			trans- α -criptoxantina	0,8	\pm	0,5
vermelho		4	13-cis- β -caroteno	0,4	\pm	0,2
			trans- β -caroteno	3,8	\pm	0,7
			9-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,2
Quiabo	<i>Hibiscus esculentus</i>	5	13-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	2,7	\pm	0,6
			9-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
Tomate Santa Cruz	<i>Lycopersicon esculentum</i>	5	trans- β -caroteno	5,1	\pm	0,4
			trans- γ -caroteno	0,7	\pm	0,3
Marglobe		5	trans- β -caroteno	6,2	\pm	0,3
			trans- γ -caroteno	0,6	\pm	0,2
Vagem Macarrão	<i>Vicia faba</i>	5	trans- α -caroteno	0,2	\pm	0,1
			13-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	1,2	\pm	0,2
			9-cis- β -caroteno	0,3	\pm	0,1

^a cada lote foi analisado em duplicata.

tr - traços

Pequenas quantidades de *trans*- β -criptoxantina foram encontradas em milho, enquanto que em abóbora e pimentão amarelo foi detectado a *trans*- α -criptoxantina, também em baixos teores.

A composição de pró-vitamina A de algumas hortaliças cozidas foi também determinada (TABELA 17). *Cis*-isômeros foram detectados em todas as hortaliças cozidas analisadas, inclusive em cenoura. A faixa de concentração média ficou em 0,1-1,2 $\mu\text{g/g}$ para 13-*cis*- β -caroteno, 0,1-1,8 $\mu\text{g/g}$ para 9-*cis*- β -caroteno e 0,8-36,1 $\mu\text{g/g}$ para *trans*- β -caroteno. *Cis*- α -caroteno só foi observado em cenoura cultivar Nantes (0,2 $\mu\text{g/g}$ de 13-*cis*) e em abóbora cozida (0,8 $\mu\text{g/g}$ de 13-*cis* e 0,3 $\mu\text{g/g}$ de 9-*cis*). Em abóbora refogada não foi observada a presença de isômeros de α -caroteno.

Com o processamento a quantidade de isômeros de β -caroteno, em termos percentuais, aumentou em 1% na cenoura (nos dois cultivares analisados), 15% no giló, 7% no quiabo, 4% na abóbora cozida e 1% na abóbora refogada. Ocorreu também um aumento de 1% e 5% de isômeros do α -caroteno na cenoura e abóbora cozidas, respectivamente. Para brócolis, vagem cozida e refogada, por outro lado, houve respectivamente uma diminuição de 0,2%, 6%, 2% na quantidade de isômeros do β -caroteno. Em abóbora refogada os isômeros do α -caroteno desapareceram.

A exemplo das frutas, os valores de vitamina A para os vegetais que continham isômeros foram calculados, empregando as biopotências obtidas por DEUEL et alii (1945), baseadas no crescimento de ratos, com e sem a separação das formas isoméricas (TABELA 18). Superestimações de 10-22%, sensivelmente maiores que as observadas para frutas, foram constatadas quando os isômeros não foram separados. A superestimação dos valores de vitamina A para hortaliças frescas como agrião (14%), brócolis (19%), couve (19%), espinafre (16%), giló (17%), milho (22%), pimentão verde (19%), amarelo (20%) e vermelho (22%) e quiabo (16%) é considerável e portanto recomendável que a separação dos isômeros faça parte da análise

Tabela 17: Concentração de *cis*- e *trans*-isômeros de pró-vitaminas A em hortaliças cozidas.

Hortaliças	preparo doméstico	n ^o de lotes analisados ^a	pró-vitamina A	concentração (µg/g)	
Abóbora	cozido	5	13- <i>cis</i> -α-caroteno	0,8 ± 0,3	
			<i>trans</i> -α-caroteno	15,6 ± 2,1	
			9- <i>cis</i> -α-caroteno	0,3 ± 0,2	
			13- <i>cis</i> -β-caroteno	1,0 ± 0,4	
			<i>trans</i> -β-caroteno	21,1 ± 2,5	
			9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,4 ± 0,2	
			<i>trans</i> -α-criptoxantina	0,6 ± 0,2	
	refogado	5	<i>trans</i> -α-caroteno	18,0 ± 3,1	
			<i>trans</i> -β-caroteno	20,7 ± 1,8	
			9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,7 ± 0,2	
			<i>trans</i> -α-criptoxantina	0,7 ± 0,1	
	Brócolis	cozido	4	13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,6 ± 0,2
				<i>trans</i> -β-caroteno	14,9 ± 1,1
				9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,8 ± 0,5
Cenoura Imperador	cozido	4	<i>trans</i> -α-caroteno	16,3 ± 0,4	
			13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,2 ± 0,1	
			<i>trans</i> -β-caroteno	36,1 ± 2,0	
			9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,1 ± 0,1	
			Nantes	4	13- <i>cis</i> -α-caroteno
	<i>trans</i> -α-caroteno	13,4 ± 1,2			
	13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,2 ± 0,1			
	<i>trans</i> -β-caroteno	30,3 ± 1,6			
	9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,1 ± 0,1			
	Espinafre	cozido	5	13- <i>cis</i> -β-caroteno	1,2 ± 0,2
<i>trans</i> -β-caroteno				20,5 ± 2,0	
9- <i>cis</i> -β-caroteno				1,8 ± 0,7	
Giló	cozido	5	13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,2 ± 0,1	
			<i>trans</i> -β-caroteno	1,4 ± 0,3	
			9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,2 ± 0,1	

Quiabo	cozido	5	13-cis- β -caroteno	0,1	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	1,8	\pm	0,6
			9-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,2
Vagem	cozido	5	trans- α -caroteno	0,2	\pm	0,1
			13-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,2
			trans- β -caroteno	1,0	\pm	0,2
			9-cis- β -caroteno	0,1	\pm	0,1
	refogado	5	13-cis- β -caroteno	0,2	\pm	0,1
			trans- β -caroteno	0,8	\pm	0,2
			9-cis- β -caroteno	0,1	\pm	0,1

* cada lote foi analisado em duplicata.

TABELA 18: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros, em hortaliças "in natura".

hortaliças	valor de vitamina A (RE/100g) [±]						
	sem separação dos isômeros	com separação dos isômeros			% superestimação		
		a	b	c	a	b	c
Abóbora							
Menina Verde	599	543	568	-	10	5	-
Agrião	486	418	432	446	14	11	8
Brócolis	397	322	332	345	19	13	12
Cenoura							
Imperador	798	-	-	-	-	-	-
Nantes	899	-	-	-	-	-	-
Couve							
Manteiga	598	486	510	538	19	15	10
Espinafre	538	454	475	482	16	12	7
Giló	29	24	25	26	17	14	10
Milho	41	32	35	38	22	15	7
Pimentão							
verde	47	38	40	42	19	15	11
amarelo	49	39	42	46	20	14	6
vermelho	87	68	72	75	22	17	14
Quiabo	57	48	50	52	16	12	9
Tomate							
Santa Cruz	91	-	-	-	-	-	-
Marglobe	104	-	-	-	-	-	-
Vagem							
Macarrão	29	26	27	28	10	7	3

[±] os valores são médias de 5 determinações em duplicatas
a - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945).
b - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945), corrigido pela perda na coluna.
c - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por SWEENEY & MARSH (1973), corrigido pela perda na coluna.

dessas hortaliças. Essas porcentagens tornam-se, entretanto, menores se as perdas ocorridas na coluna de Ca(OH)_2 e os valores de biopotência apresentados por SWEENEY & MARSH (1973) (74% para o 13-cis- β -caroteno e 61% para o 9-cis- β -caroteno), baseados no conteúdo de vitamina A no fígado, forem considerados (TABELA 18), ficando entre 3-14%. Portanto, a reavaliação das biopotências, utilizando técnicas mais modernas para que se obtenham os verdadeiros valores, é imprescindível, como enfatizaram RODRIGUEZ-AMAYA & TAVARES (1992).

Para alimentos contendo isômeros do α -caroteno, como por exemplo abóbora, o cálculo da superestimação não pode ser feito pelas biopotências de SWEENEY & MARSH, já que eles não estudaram este pigmento.

Para hortaliças cozidas, a superestimação, utilizando as biopotências determinadas por DEUEL et alii (1944, 1945), variou de 5-20% (TABELA 19), sendo que os maiores valores foram para abóbora cozida (20%), vagem refogada (16%), quiabo cozido (16%) e espinafre cozido (15%). Se forem também consideradas as perdas na coluna e as biopotências obtidas por SWEENEY & MARSH (1973), as superestimações diminuem para 3-8%. Portanto, as mesmas considerações feitas em relação à reavaliação das biopotências também se aplicam aqui.

5.3.3. Confirmação da Ocorrência de Isômeros de Pró-vitaminas A por CLAE

Para a separação dos isômeros das pró-vitaminas, foram testadas colunas de fase normal (NH_2 , CN, Ca(OH)_2) e colunas de fase reversa (C_{18}). A escolha pela fase reversa se deu primeiramente pelo menor risco de formação de produtos de

TABELA 19: Valores de vitamina A calculados com e sem a separação dos isômeros, em hortaliças cozidas.

hortaliças	valor de vitamina A (RE/100g) ¹							
	sem separação dos isômeros	com separação dos isômeros			% superestimação			
		a	b	c	a	b	c	
Abóbora								
cozida	627	502	527	-2	20	10	-2	
refogada	525	499	520	-2	5	1	-2	
Brócolis								
cozido	298	259	271	276	13	9	7	
Cenoura								
Imperador cozida	790	740	772	-2	7	2	-2	
Nantes cozida	686	620	647	-2	10	6	-2	
Espinafre								
cozida	427	364	381	392	15	10	8	
Giló								
cozido	29	25	26	28	14	10	3	
Quiabo								
cozido	38	32	34	36	16	10	5	
Vagem								
cozida	24	21	22	24	13	8	0	
refogada	19	16	17	18	16	11	5	

¹ os valores são médias de 5 determinações em duplicatas

² Não calculados, a bioatividade dos isômeros do α -caroteno não foram estabelecidas por SWEENEY & MARSH (1973).

a - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945).

b - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por DEUEL et alii (1945), corrigido pela perda na coluna.

c - calculado de acordo com a atividade biológica obtida por SWEENEY & MARSH (1973), corrigido pela perda na coluna.

degradação durante a cromatografia (LAMBERT et alii, 1985) e porque são encontradas facilmente no comércio. Das quatro marcas de colunas C₁₈ utilizadas, Econosphere, Spherisorb ODS-1, LiChrospher e Vydac, esta última foi a que apresentou uma melhor resolução para os isômeros, confirmando as observações feitas anteriormente por QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) e por O'NEIL et alii (1991).

Para a separação apenas dos isômeros das pró-
vitaminas, não se justificava o uso de gradiente de fase móvel e dentro desse pensamento foram testados como fase móvel em sistema isocrático além do metanol puro, misturas em diferentes proporções de metanol com clorofórmio, tetrahidrofurano, acetonitrila e água. Metanol/acetonitrila (90:10) e metanol/água (98:2) apresentaram as melhores resoluções. Para evitar o uso de substâncias tóxicas e ter um menor tempo de análise, optou-se pela mistura de metanol/água.

O comprimento de onda utilizado foi de 450 nm, embora a 436 e 445 nm os cromatogramas não apresentaram grandes alterações.

Ainda assim, a técnica de separação de isômeros por CLAE necessita de maiores aprimoramentos e somando este fato aos outros problemas citados a respeito da quantificação, os resultados obtidos por CLAE só foram analisados de forma qualitativa.

5.3.3.1. Em frutas

Os cromatogramas obtidos por CLAE, alguns dos quais são mostrados nas FIGURAS 8 e 9, confirmam os resultados das determinações feitas por coluna aberta. Na FIGURA 8, os dois

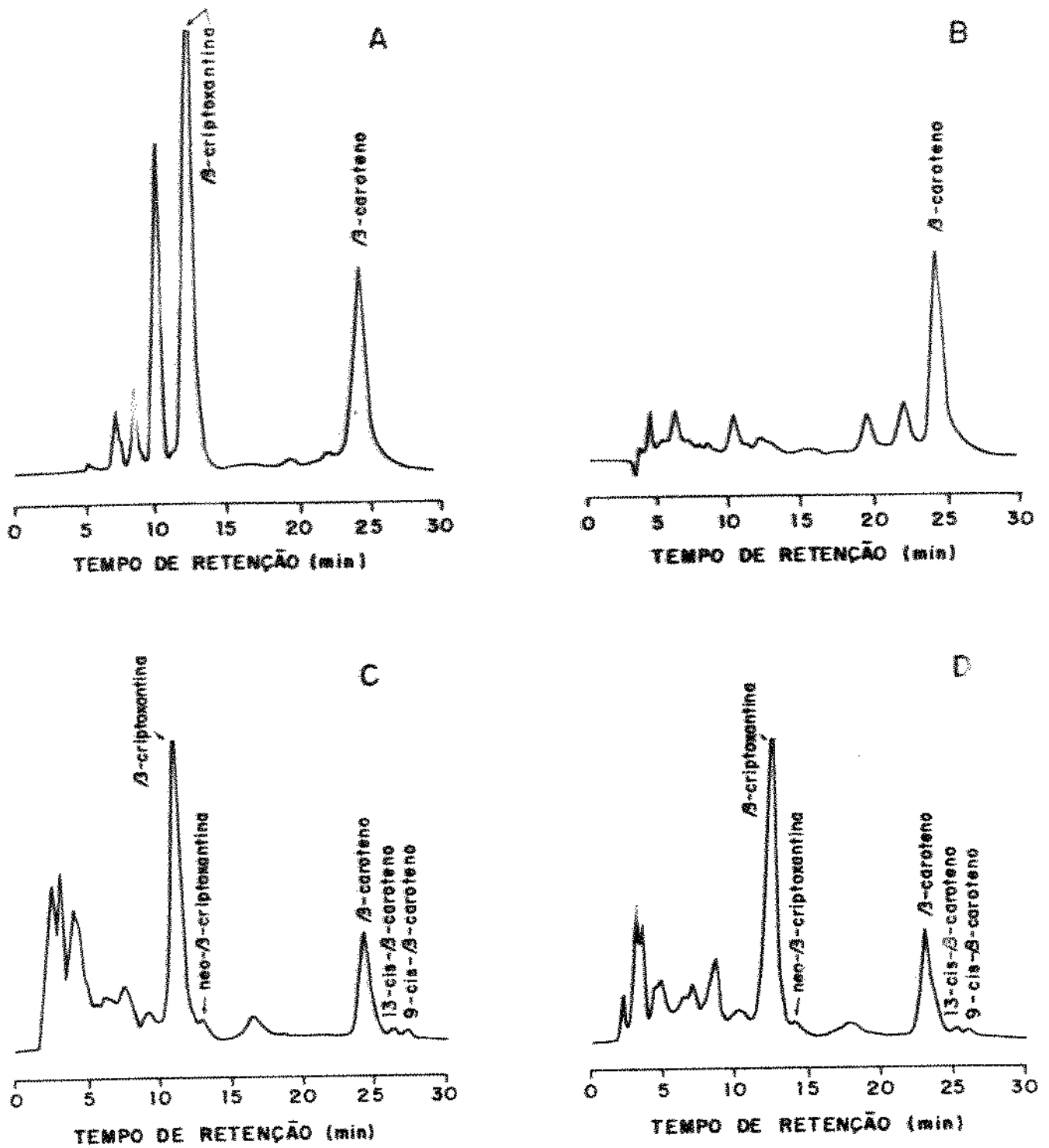


FIGURA 8: Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos totais de (A) mamão, (B) maracujá, (C) nectarina e (D) pêssego.

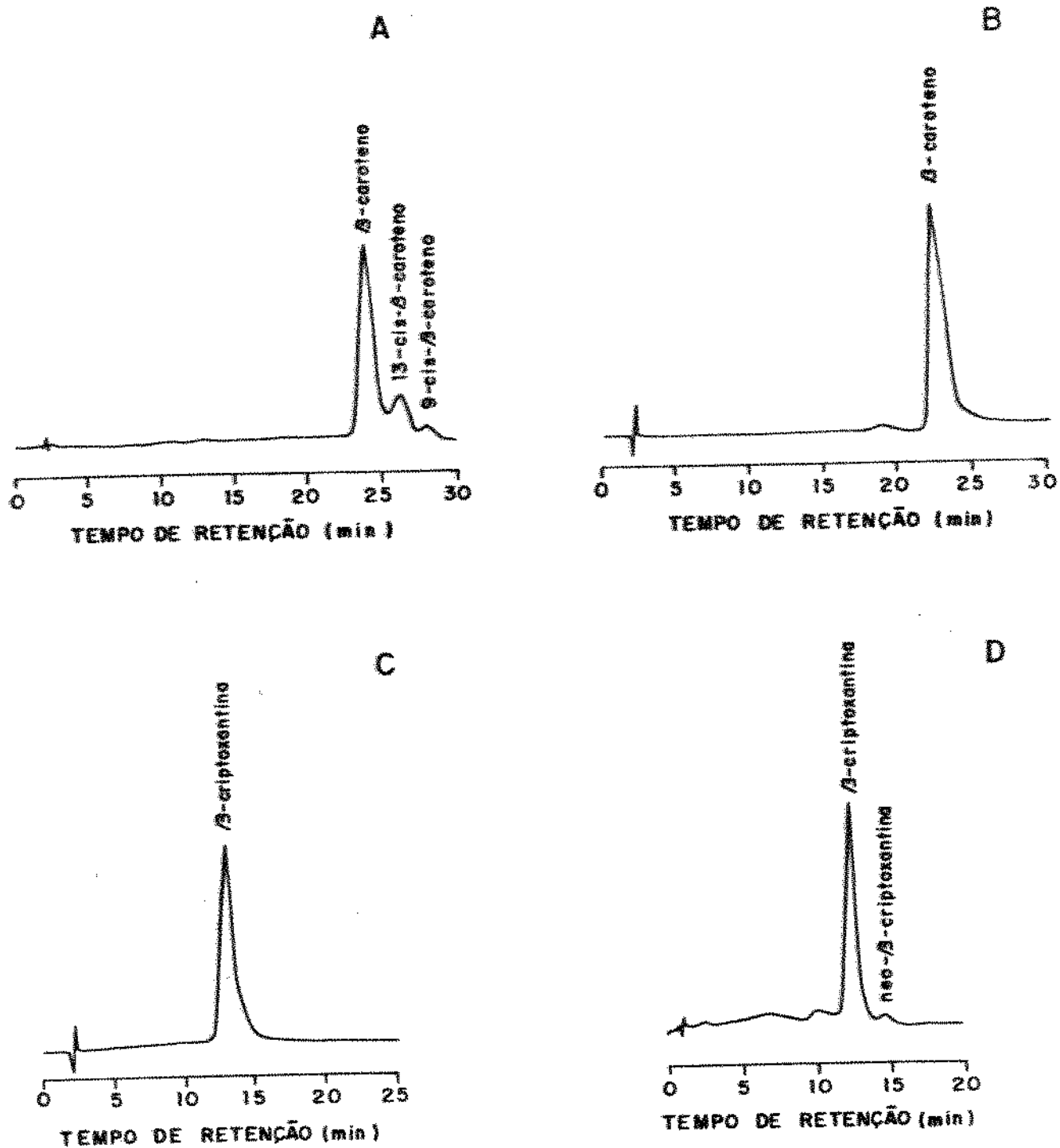


FIGURA 9: Cromatogramas obtidos por CLAE das frações pró-vitamínicas separadas pela coluna de MgO:hiflosuperpel: (A) fração de β -caroteno de pêssego, (B) fração de β -caroteno de mamão, (C) fração de β -criptoxantina de mamão e (D) fração de β -criptoxantina de pêssego.

primeiros cromatogramas (8A e 8B) mostram a ausência de isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina em mamão e do β -caroteno em maracujá. Os outros dois cromatogramas demonstram a presença de *cis*-isômeros de β -caroteno e β -criptoxantina em nectarina (8C) e pêssego (8D). Os cromatogramas dos extratos totais foram confirmados pelo perfil dos cromatogramas das frações de pró-vitaminas isoladas em coluna de MgO:hiflosupercel. A fração de β -caroteno de pêssego (FIGURA 9A) mostra os dois isômeros enquanto na de mamão não há esses isômeros (FIGURA 9B). A fração de β -criptoxantina de mamão está destituída de isômeros (9C) enquanto a de pêssego apresenta o *cis*-isômero (9D).

Nossos cromatogramas são comparáveis aos obtidos por outros autores (QUACKENBUSH, 1987; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; PETERSSON & JONSSON, 1990; O'NEIL et alii, 1991; SALEH & TAN, 1991) em termos de separação de isômeros.

A presença de *cis*-isômeros do β -caroteno foi reportada em pêssego, damasco e ameixa por CHANDLER & SCHWARTZ (1987) e em pêssego e damasco por QUACKENBUSH (1987), usando métodos por CLAE. Esses autores não verificaram a ocorrência de β -criptoxantina, assim como da sua forma isomérica.

Especialmente em artigos utilizando CLAE, há muito mais dados na literatura sobre a separação de isômeros do β -caroteno e α -caroteno, do que a quantificação da β -criptoxantina, mesmo na sua configuração *trans*. Os resultados deste estudo mostram que, pelo menos para frutas, a quantificação da β -criptoxantina é muito mais importante para a determinação do valor de vitamina A que a separação dos isômeros.

5.3.3.2. Em hortaliças

Também em hortaliças os cromatogramas obtidos por CLAE confirmaram os resultados das determinações em coluna aberta.

Alguns cromatogramas de hortaliças não verdes analisadas estão apresentados na FIGURA 10. Os dois primeiros cromatogramas (10A e 10B) mostram a ausência e a presença dos isômeros do α - e do β -caroteno em cenoura e abóbora, respectivamente. Os outros dois cromatogramas demonstram a ausência em tomate (10C) e presença em pimentão vermelho (10D) dos isômeros da fração de β -caroteno isolada em coluna de MgO:hiflosupercel.

Na FIGURA 11 estão os cromatogramas das hortaliças verdes, como brócolis (11A), couve (11B), espinafre (11C) e vagem (11D). Em todos eles há a presença dos dois principais isômeros do β -caroteno, valendo ressaltar que a altura do pico correspondente ao 9-*cis* é um pouco superior a do 13-*cis*- β -caroteno, inversamente ao que foi observado em frutas e hortaliças não verdes, confirmando os dados observados em coluna aberta.

Para as hortaliças "in natura" que possuíam isômeros *cis*, os cromatogramas obtidos após cozimento foram praticamente idênticos. No caso de cenoura, os isômeros *cis*, inexistentes na amostra fresca, surgiram após o cozimento (FIGURA 12).

A FIGURA 13 apresenta o cromatograma e os espectros de absorção dos isômeros da fração de β -caroteno de espinafre, obtida a partir de coluna de MgO:hiflosupercel, utilizando o detector de arranjo de diodos. O resultado confirma novamente a ordem de eluição do 13-*cis*- e 9-*cis*- β -caroteno, no sistema cromatográfico utilizado.

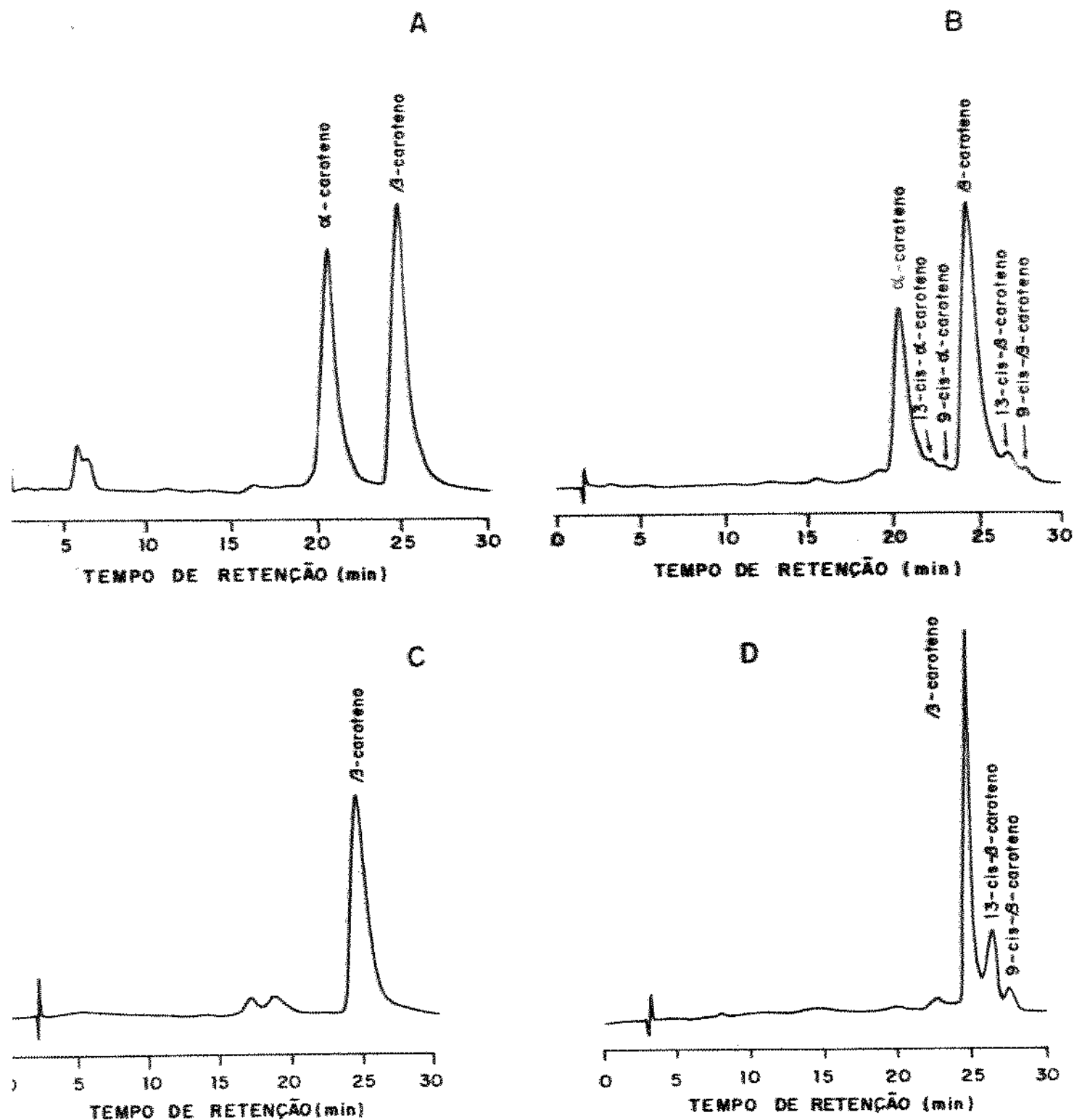


FIGURA 10: Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos totais de (A) cenoura e (B) abóbora, e das frações de β -caroteno, isoladas através de coluna de MgO:hiflosuperpel, de (C) tomate e (D) pimentão vermelho.

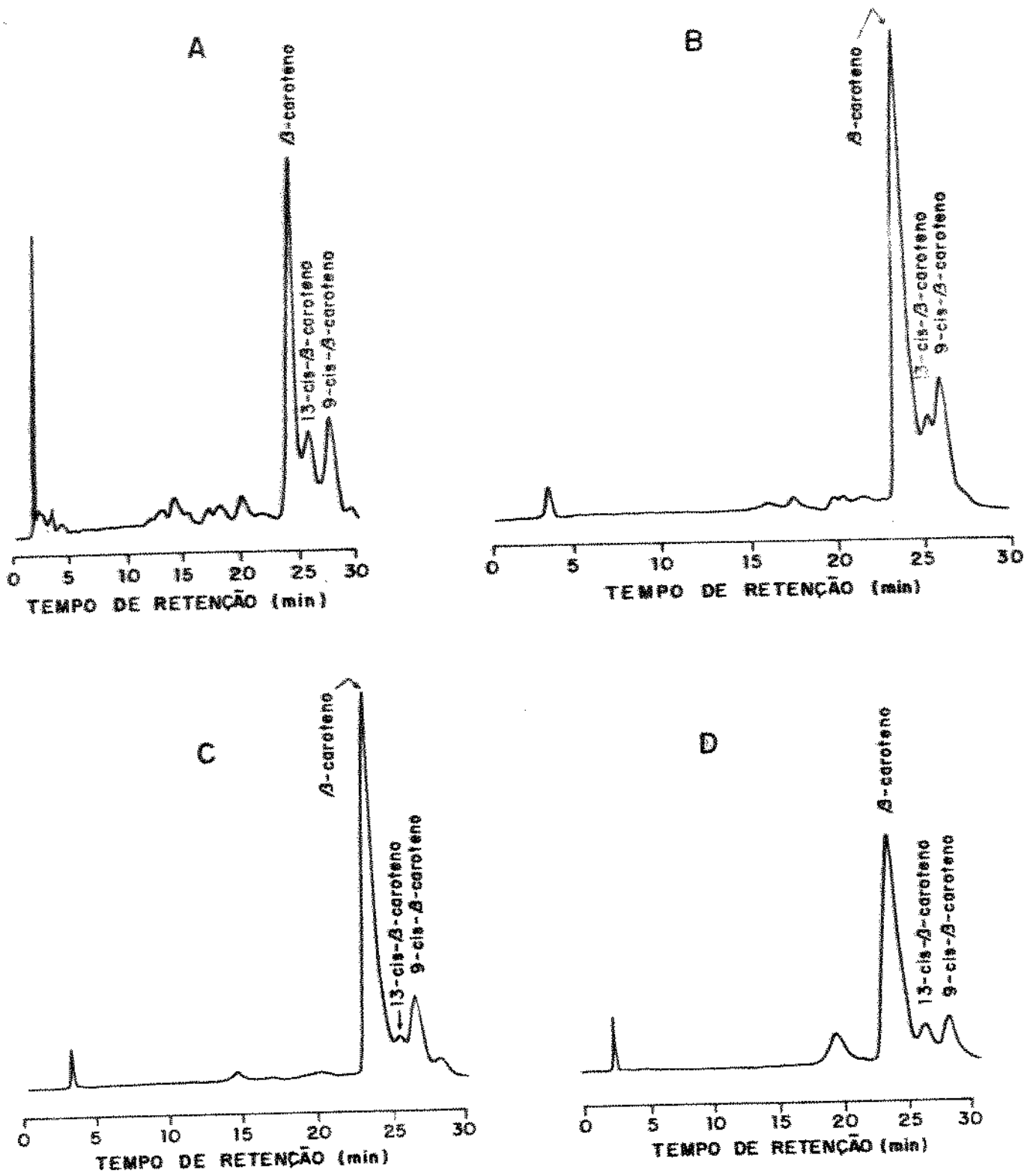


FIGURA 11: Cromatogramas obtidos por CLAE das frações de β -caroteno obtidas a partir da coluna de MgO:hiflosuperpel: (A) brócolis, (B) couve, (C) espinafre e (D) vagem.

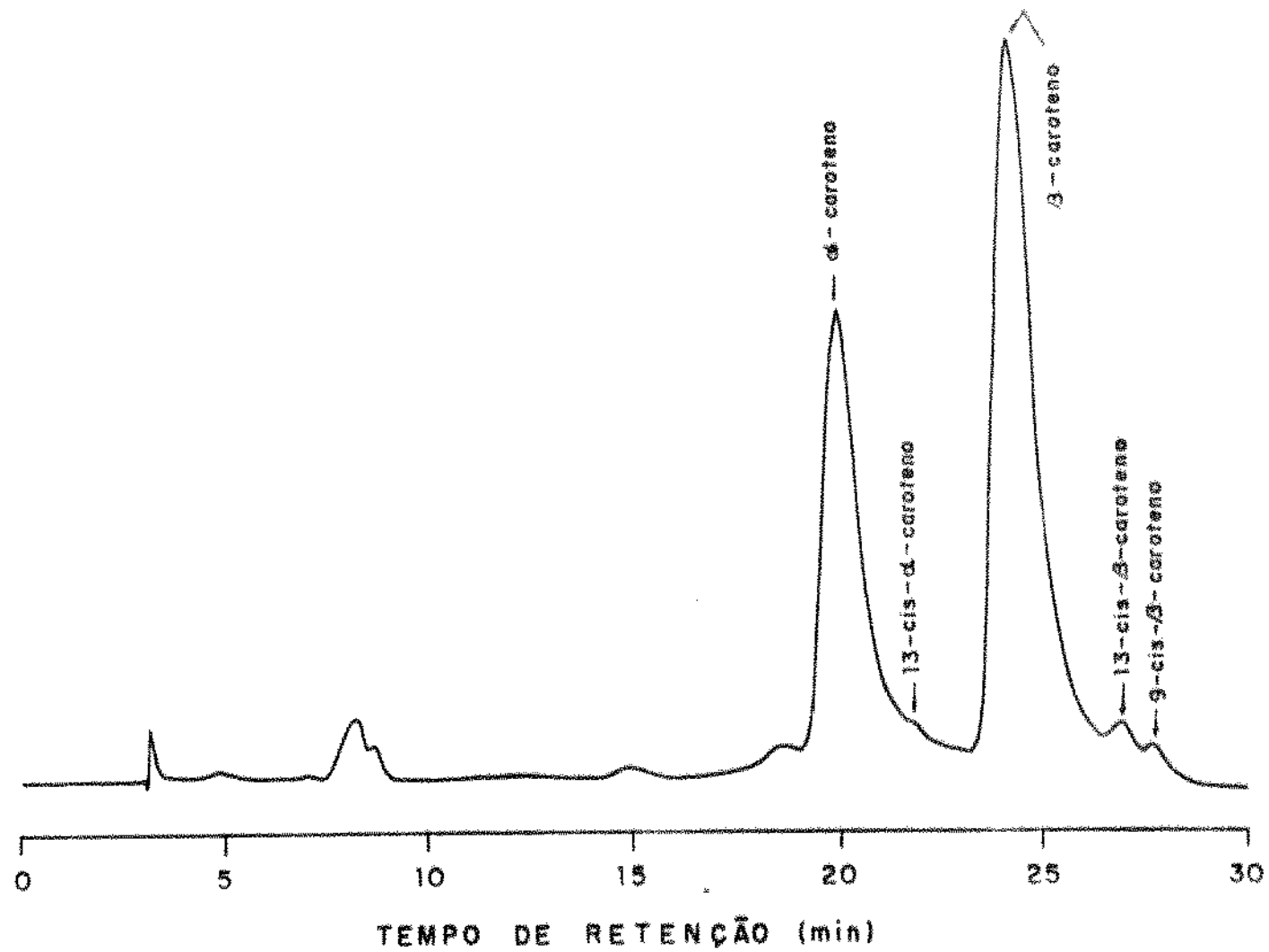


FIGURA 12: Cromatograma obtido por CLAE do extrato total de cenoura cultivar Nantes cozida.

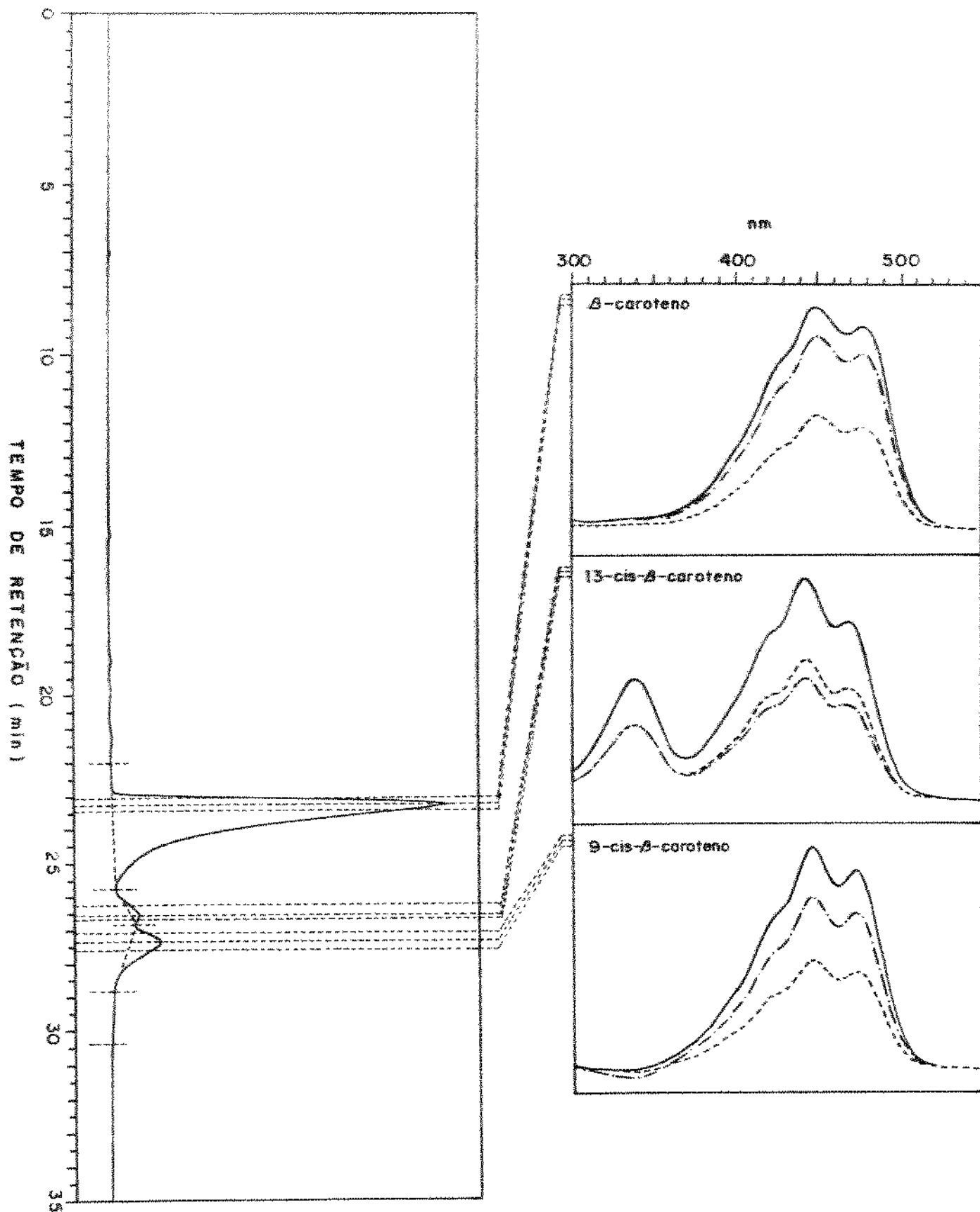


FIGURA 13: Cromatograma e espectros de absorção dos isômeros do β -caroteno de espinafre, obtidos utilizando o detector de arranjo de diodos.

5.3.4. Comparação com os dados da literatura das porcentagens dos isômeros do β -caroteno

Na maioria dos trabalhos realizados, os níveis de *cis*-isômeros são reportados apenas em porcentagens e não em concentrações absolutas. A TABELA 20 apresenta comparativamente os resultados em porcentagens obtidos neste trabalho, por cromatografia de coluna aberta, com os dados encontrados na literatura, utilizando métodos envolvendo a CLAE.

Os dados deste trabalho se mostraram muito próximos aos de CHANDLER & SCHWARTZ (1987) em amostras "in natura" de cenoura, couve, espinafre e pêssego. Assim como no presente estudo, os autores não detectaram isômeros de cenoura, embora QUACKENBUSH (1987) tenha encontrado 1,2% para o 13-*cis* e 0,4% para o 9-*cis*. Para abóbora e nectarina as porcentagens de isômeros encontradas por CHANDLER & SCHWARTZ foram bem maiores que as observadas neste trabalho. Os valores apresentados por QUACKENBUSH são nitidamente menores para hortaliças verdes (couve e espinafre), mas maiores para pêssego. Os resultados apresentam maior variação ainda com relação aos alimentos cozidos, o que era esperado devido às prováveis diferenças nas condições do preparo.

TABELA 20: Isômeros cis-trans do β -caroteno encontrados em frutas e hortaliças frescas e cozidas.

produto		% 13-cis			% trans			% 9-cis		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
abóbora	fresca	15,3	5,0	0,8	75,0	93,6	97,9	9,7	1,4	1,2
	cozida	22,0	-	4,4	66,6	-	93,8	11,4	-	1,8
	refogada	-	-	0,0	-	-	96,7	-	-	3,3
cenoura	fresca	0,0	1,2	0,0 ^a	100,0	98,4	100,0 ^a	0,0	0,4	0,0 ^a
		-	-	0,0 ^b	-	-	100,0 ^b	-	-	0,0 ^b
	cozida	19,1	13,8	0,5 ^a	72,8	79,9	99,2 ^a	8,1	6,3	0,3 ^a
		-	-	0,6 ^b	-	-	99,0 ^b	-	-	0,4 ^b
couve	fresca	16,6	4,4	10,2	71,8	83,0	77,5	11,7	12,6	12,3
espinafre	fresca	8,8	3,2	7,7	80,4	89,4	83,3	10,8	7,4	9,0
	cozida	15,3	-	5,1	58,4	-	87,2	26,3	-	7,7
pêssego	fresco	9,4	23,6	13,3 ^c	83,7	70,4	80,0 ^c	6,9	6,0	6,7 ^c
		-	-	22,2 ^d	-	-	66,7 ^d	-	-	11,1 ^d
nectarina	fresca	13,5	-	7,7	76,6	-	84,6	10,0	-	7,7

1 CHANDLER & SCHWARTZ (1987)

2 QUACKEMBUSH (1987)

3 obtidos neste trabalho

^a cenoura Nantes e ^b cenoura Imperador

^c pêssego Diamante e ^d pêssego chileno

5.4. Triagem da Composição de Carotenóides de Abricó, Buriti, Pequi, Nêspera, Pêssego e Nectarina.

Considerando a crescente importância conferida aos carotenóides, inclusive os não pró-vitamínicos, foram determinadas as composições completas de carotenóides de várias frutas brasileiras ainda não analisadas ou apenas parcialmente estudadas.

Inicialmente, foi realizada uma triagem, cuja eficiência já havia sido demonstrada anteriormente por MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA (1991b). Um esquema simplificado das placas, após desenvolvimento em cada solvente, é apresentado na FIGURA 14 e o resultado da triagem está contido na TABELA 21.

Os carotenos presentes nas amostras são evidenciados após o desenvolvimento em solução contendo 10% de éter etílico em éter de petróleo. Assim, o buriti apresentou 5 carotenos, o abricó, a nêspera, a nectarina e o pêssego 4 e o pequi 3. Com o desenvolvimento subsequente em 70% de éter etílico em éter de petróleo os carotenos se compactaram em uma única mancha na frente do solvente e os mono-hidroxilados foram evidenciados. Nêspera, nectarina e pêssego apresentaram 3 mono-hidroxilados, enquanto que abricó e pequi apenas 1. O buriti não apresentou nenhum pigmento mono-hidroxilado. Com o desenvolvimento em 5% de etanol em éter de petróleo os mono-hidroxilados correram com a frente do solvente e os di-hidroxilados foram evidenciados. A nectarina e o pêssego acusaram 5 di-hidroxilados, o abricó e a nêspera 3, o pequi 2 e o buriti apenas 1. O buriti apresentou apenas uma xantofila, tendo sua composição quase que restrita a carotenos.

As triagens feitas tanto em placas de sílica gel de CCD normal e CCD de alta eficiência sempre apresentaram o mesmo resultado, embora nesta última a visualização das manchas tenha sido mais nítida.

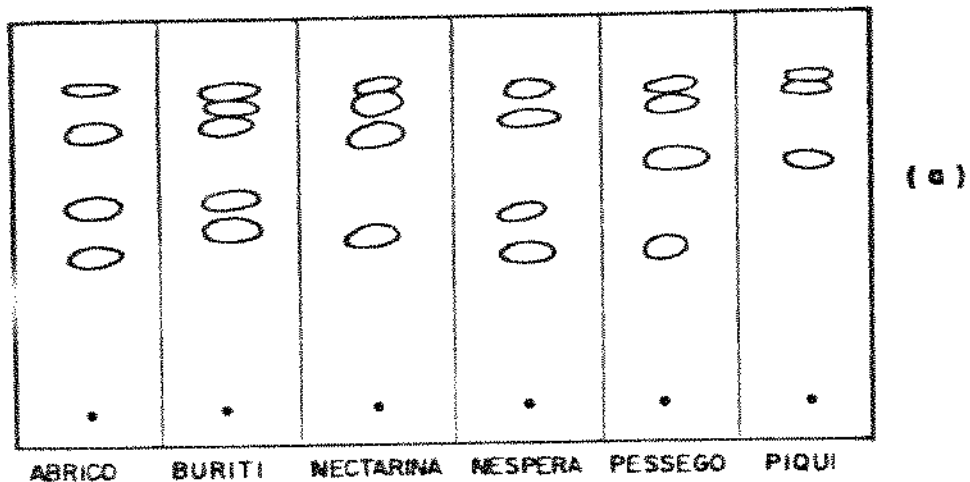
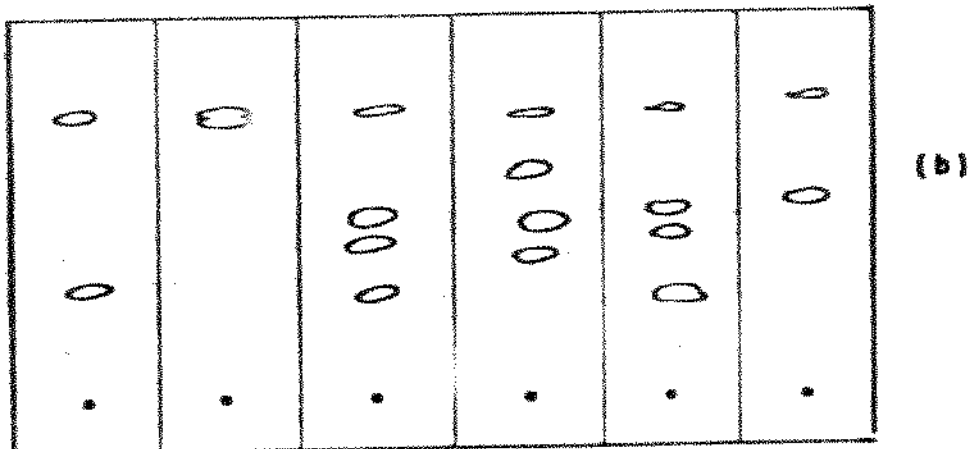
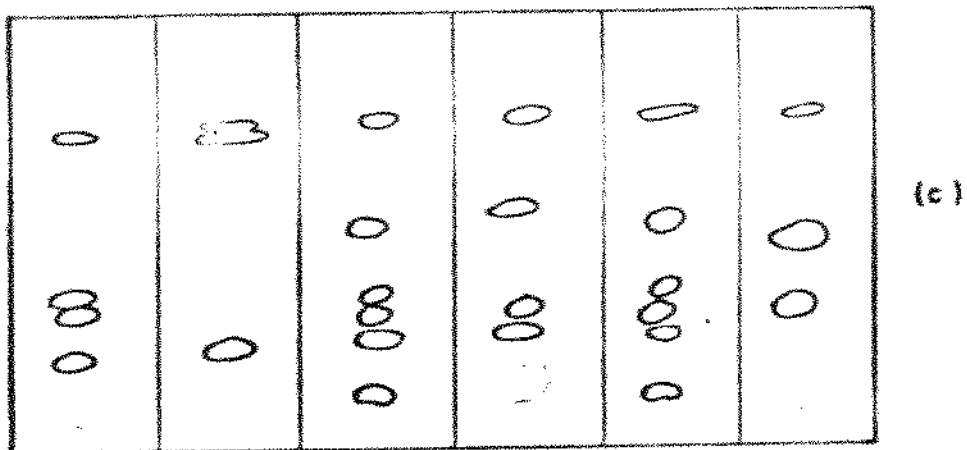


FIGURA 14: Aspecto das placas de sílica gel após desenvolvimento em 10% de éter etílico em éter de petróleo (a); 70% de éter etílico em éter de petróleo (b) e 5% de etanol em éter de petróleo (c).

TABELA 21: Resultado da triagem da composição de carotenóides

Fruta	número de carotenóides		
	carotenos	mono-hidroxilados	di-hidroxilados
Abricó	4	1	3
Buriti	5	-	1
Pequi	3	1	2
Nêspera	4	3	3
Nectarina	4	3	5
Pêssego	4	3	5

5.5. Composição de Carotenóides de Abricó (*Mammea americana* L.)

O abricó é uma fruta nativa encontrada no norte-nordeste, embora não cultivada comercialmente. A safra é entre os meses de junho a dezembro e a polpa é consumida como tal ou em preparações como licores, geléias, néctares e sorvetes. O epicarpo grosso e firme dá uma excelente proteção, facilitando o transporte e extendendo a vida de prateleira do fruto. Isso faz com que o abricó apresente um bom potencial para a produção comercial.

Os frutos maduros apresentaram a seguinte composição de carotenóides: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, β -zeacaroteno, β -apo-10'-carotenal, β -apo-8'-carotenol, violaxantina, luteoxantina e auroxantina, composição já esperada pelos dados obtidos na triagem. As estruturas destes pigmentos estão apresentadas no ANEXO 1 e os espectros de absorção nos ANEXOS de 2 a 8. As características desses carotenóides estão resumidas na TABELA 22.

O β -caroteno e suas formas isoméricas, o ζ -caroteno e o β -zeacaroteno foram identificados através dos máximos de absorção, assim como pelo perfil dos espectros. A ausência de grupos substituintes foi confirmada pela ordem de eluição na coluna, bem como pelo comportamento na camada delgada de sílica gel desenvolvida com 3% de metanol em benzeno, eluindo junto com a frente do solvente. As formas *cis-trans* foram confirmadas por fotoisomerização catalisada por iodo.

A fração correspondente ao β -apo-10'-carotenal apresentou um único máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ 437 nm em éter de petróleo, $\lambda_{\text{máx}}$ 449 nm em metanol e $\lambda_{\text{máx}}$ 460 nm em clorofórmio), forma característica de cetocarotenóides que foi confirmada pela

TABELA 22: Principais características dos carotenóides do abricó

pigmentos	máx (nm) ^a			A ^{1%} b lcm	atividade pró-vitamina ^c (%)	Rf	reação química
13-cis-β-caroteno	(422)	445	472	1730	53	0,98	cis +
β-caroteno	(424)	449	475	2592	100	0,99	trans +
9-cis-β-caroteno	(420)	444	472	2370	38	0,97	cis +
ζ-caroteno	382	400	425	2555	-	0,98	trans +
β-zeacaroteno	400	425	450	2520	40	0,95	trans +
β-apo-10'-carotenol		437		2190	100	0,94	red +
β-apo-8'-carotenol	378	398	420	2190	72	0,47	acet +
violaxantina	419	439	468	2550	-	0,11	acet + epox +
luteoxantina	400	422	447	2592	-	0,09	acet + epox +
auroxantina	382	400	425	2592	-	0,09	acet + epox +

^a absorção em éter de petróleo; valores entre parenteses significam ombro no lugar de pico

^b valores tabelados por DAVIES (1976) e determinados neste trabalho

^c valores determinados ZECHMEISTER (1962) e BAUERFEIND (1972)

resposta positiva à redução com NaBH_4 . Após a redução o espectro registrado apresentou três máximos de absorção: 398, 424, 442 nm em éter de petróleo. A resposta negativa à acetilação mostrou a ausência de hidroxilas.

A fração que eluiu após o β -apo-10'-carotenal, apresentou espectro de absorção com máximos a 378, 398 e 420 nm em éter de petróleo, indicando um cromóforo com cerca de 7 ligações duplas conjugadas, e seu perfil acusou uma conjugação que se estendia dentro do anel, ou então a presença de um grupo carbonila. Esta última hipótese foi eliminada pela resposta negativa à redução. O valor de R_f de 0,45 na camada delgada indicou a presença de um grupo substituinte, provavelmente uma hidroxila, que foi confirmada pela resposta positiva à acetilação. Após exposição da camada delgada a vapores de HCl não ocorreu mudança na coloração da mancha, indicando a ausência de epóxidos.

A análise de todos esses parâmetros revelou um novo pigmento ainda não relatado na literatura, cuja estrutura foi elucidada com a utilização da espectrometria de massa. A fração foi purificada em placa de camada delgada de sílica gel desenvolvida com 10% de acetona em éter de petróleo. O espectro de massa (FIGURA 15) apresentou um sinal intenso correspondente ao ion molecular M/Z 378, que corresponde a uma fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}$. Um fragmento característico a M/Z 360 ($M-18$, H_2O) confirmou a presença de hidroxila. Um outro fragmento a M/Z 319 ($M-59$) e a ausência de fragmento a M/Z 225 ($M-153$) confirmaram a localização da hidroxila na cadeia lateral e não no anel.

A partir dessas evidências a estrutura mais provável era do β -apo-8'-carotenol (FIGURA 15), que foi confirmada pelo produto da redução de um padrão sintético de β -apo-8'-carotenal com NaBH_4 , que apresentou espectros de absorção e de massa idênticos ao pigmento desconhecido (FIGURA 16).

A presença de duas hidroxilas nos três últimos pigmentos foi indicada primeiramente pelo valor de R_f na camada delgada de sílica gel, desenvolvida com 3% de metanol em benzeno,

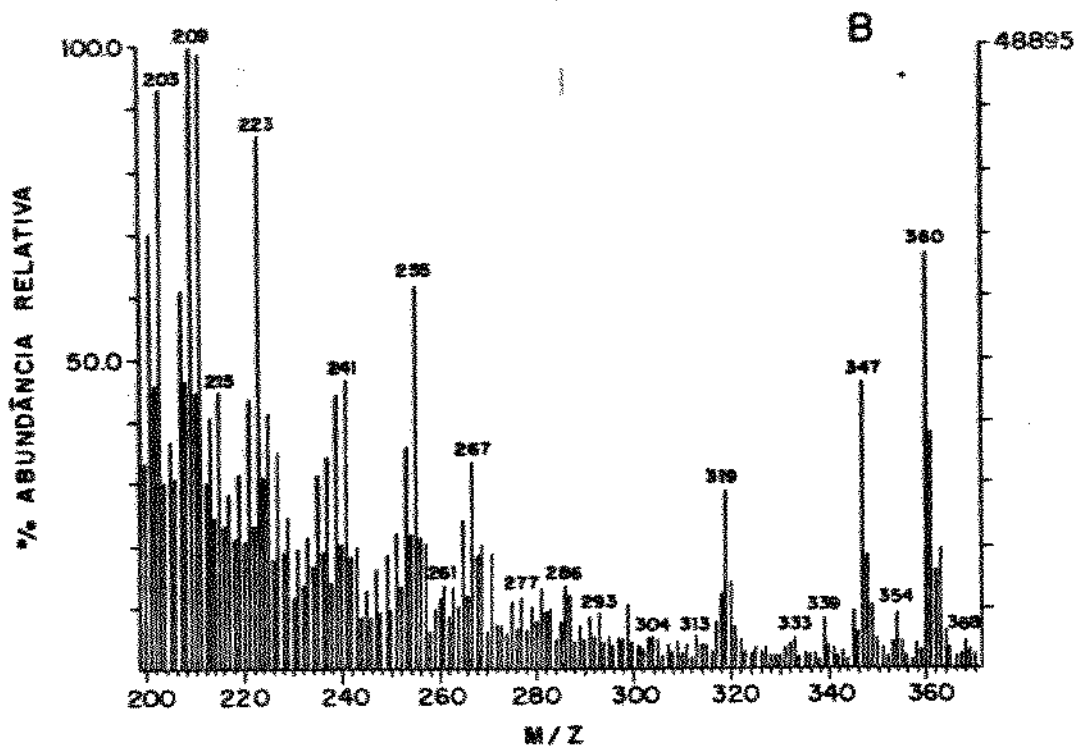
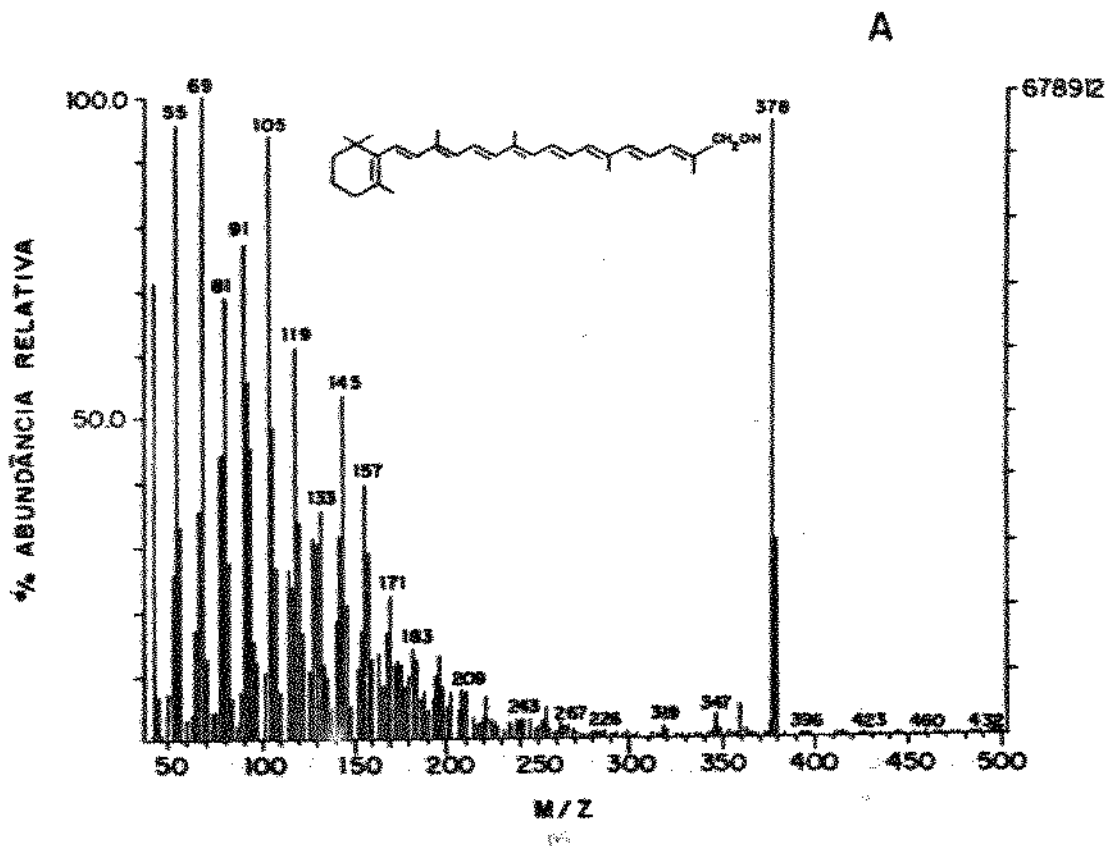


FIGURA 15: Espectro de massa do β -apo-8'-carotenol.

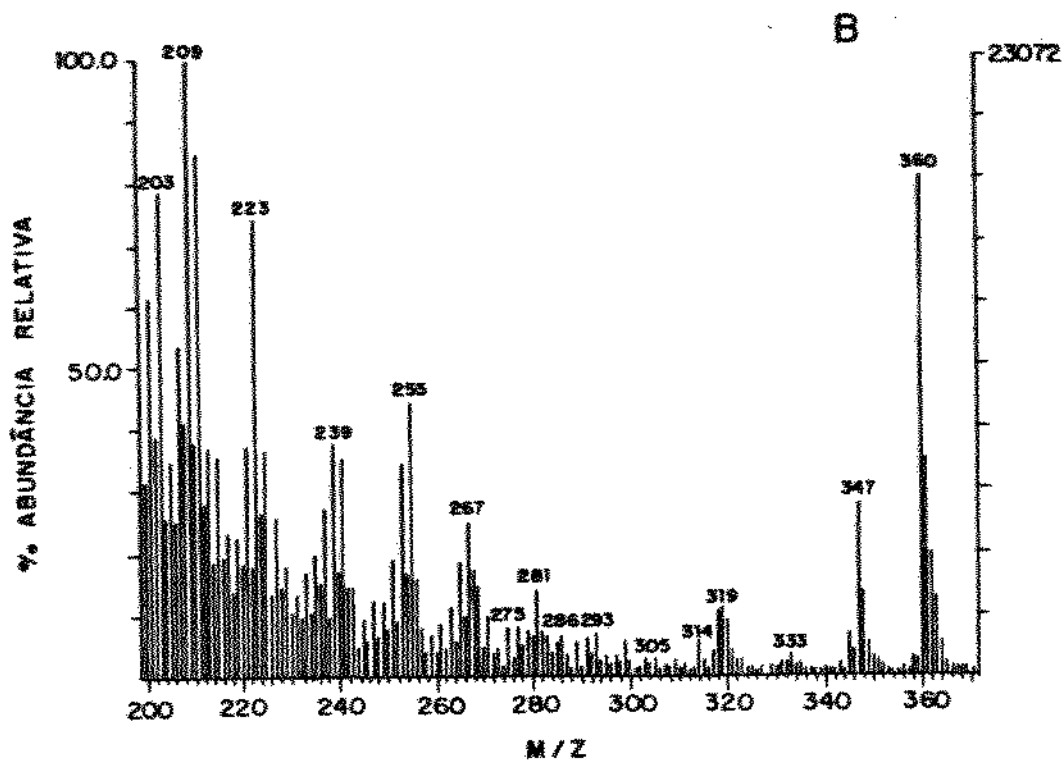
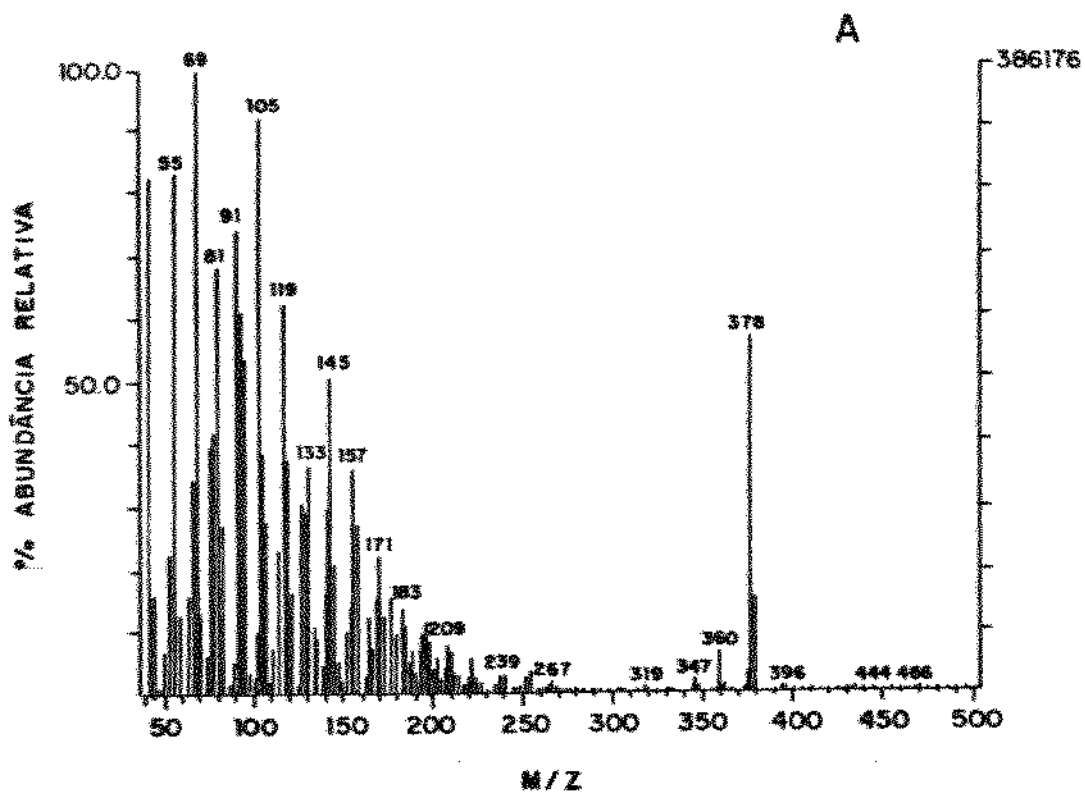


FIGURA 16: Espectro de massa do produto de redução com NaBH_4 de um padrão sintético de β -apo-8'-carotenal.

e confirmada pela resposta positiva à acetilação. Essas frações foram identificadas também como epóxidos pela mudança da coloração amarelo para azul ou verde, após exposição da camada delgada desenvolvida a vapores de HCl concentrado.

A adição de HCl 0,1N à solução etanólica da fração que eluiu logo após o β -apo-8'-carotenol, apresentou um deslocamento hipsocrômico de 40 nm, confirmando a presença de dois grupos epóxidos nas posições 5,6 e 5',6'. Todas as propriedades concordam com a identificação do pigmento como sendo a violaxantina. Com a fração que eluiu após a violaxantina, o deslocamento hipsocrômico do espectro foi de apenas 20 nm e o espectro original se apresentou também 20 nm mais baixo que o do β -caroteno, indicando a presença de um grupo epóxido na posição 5,6 e outro na posição 5',8', o que leva a identificação final da luteoxantina. A mesma reação foi realizada com a última fração porém nenhuma mudança foi observada, mas os máximos de absorção já mostraram-se 40 nm mais baixos que os do β -caroteno, indicativo da presença de dois grupos epóxidos nas posições 5,8 e 5',8', levando, portanto, à identificação da auroxantina.

Em duas das treze determinações realizadas foram encontradas pequenas quantidades de sintanaxantina, provavelmente produto da condensação aldólica. Tal reação ocorre em cetocarotenóides durante a saponificação na presença de traços de acetona. STEWART & WHEATON (1973) reportaram a conversão de β -citraurina em reticulaxantina e β -apo-8'-carotenol a citranaxantina durante a análise de citrus.

Em termos quantitativos (TABELA 23) o abricó apresentou variações maiores que aquelas normalmente encontradas em frutas. Cinco lotes (perfil 1) tiveram a violaxantina como principal pigmento, apresentando também altos teores de β -caroteno e β -apo-8'-carotenol e quantidades moderadas de β -apo-10'-carotenol. Em dois outros lotes (perfil 2) o β -caroteno foi o pigmento majoritário, com níveis altos de apocarotenol e violaxantina. Nos seis outros lotes (perfil 3) o β -apo-8'-carotenol foi o carotenóide principal, com altos teores de

TABELA 23: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A do abricó

pigmentos	perfil 1		perfil 2		perfil 3	
	intervalo	M \pm dp	intervalo	M \pm dp	intervalo	M \pm dp
13-cis- β -caroteno	ND-0,5	0,3 \pm 0,2	0,4-0,6	0,4 \pm 0,2	0,1-0,4	0,3 \pm 0,1
β -caroteno	14,3-17,9	16,4 \pm 1,3	16,3-19,1	18,0 \pm 1,5	8,7-12,2	9,5 \pm 2,1
9-cis- β -caroteno	ND-0,4	0,2 \pm 0,2	0,3-0,6	0,4 \pm 0,2	ND-0,4	0,2 \pm 0,2
ζ -caroteno	0,8-1,6	1,3 \pm 0,4	1,1-2,3	1,7 \pm 0,5	ND-0,6	0,3 \pm 0,2
β -zeacaroteno	0,3-0,9	0,7 \pm 0,2	ND-0,4	0,3 \pm 0,2	0,4-0,7	0,6 \pm 0,2
β -apo-10'-carotenal	3,5-5,2	4,5 \pm 0,7	4,8-6,1	5,7 \pm 0,6	3,6-5,0	4,3 \pm 0,7
β -apo-8'-carotenol	6,5-13,8	10,8 \pm 3,3	10,4-14,7	12,2 \pm 2,6	13,8-15,6	14,6 \pm 0,9
violaxantina	28,4-41,6	33,4 \pm 6,2	11,2-19,4	13,8 \pm 5,1	10,2-12,4	11,5 \pm 0,8
luteoxantina	ND-0,4	0,2 \pm 0,2	0,6-1,1	0,9 \pm 0,3	0,2-1,0	0,7 \pm 0,4
auroxantina	ND-0,9	0,6 \pm 0,4	1,8-2,7	2,1 \pm 0,5	2,4-3,0	2,8 \pm 0,4
total	54,6-79,14	68,4 \pm 16,4	33,1-58,7	45,6 \pm 12,7	30,8-57,3	44,1 \pm 13,6
valor de vitamina A (RE/100g)	436-533	487 \pm 48	497-601	550 \pm 61	371-458	414 \pm 47

perfil 1: média de 5 determinações em duplicata de frutas que apresentaram a violaxantina como principal pigmento.

perfil 2: média de 2 determinações em duplicata de frutas que apresentaram o β -caroteno como principal pigmento.

perfil 3: média de 6 determinações em duplicata de frutas que apresentaram o β -apo-8'-carotenol como principal pigmento.

ND- não detectado.

violaxantina e de β -caroteno. Além disso, por duas razões a composição foi atípica: a presença de β -apo-10'-carotenal, especialmente em alto teor e de um novo carotenóide, β -apo-8'-carotenol, também em concentrações apreciáveis, chegando a ser o pigmento principal em algumas amostras.

O valor de vitamina A encontrado foi significativo (483 RE/100g) devido a quantidades elevadas de β -caroteno e β -apo-10'-carotenal, que são pigmentos que possuem as maiores atividades pró-vitâmicas A (100%). Pela sua estrutura, o β -apo-8'-carotenol deve ser também uma pró-vitamina, e para fins de cálculo foi considerado com a mesma atividade do β -apo-10'-carotenal (72%).

O perfil da composição de carotenóides do abricó obtido por CLAE, com o mesmo sistema de coluna e fase móvel utilizados para a observação da ocorrência de isômeros, confirmou a composição qualitativa obtida por coluna aberta. A identificação dos pigmentos majoritários foi feita através do enriquecimento dos picos com padrões ou com os pigmentos isolados.

A CLAE proporcionou ainda mais evidências na identificação do β -apo-8'-carotenol e β -apo-10'-carotenal. Padrão sintético de β -apo-8'-carotenol, mostrou um tempo de retenção na CLAE diferente do β -apo-10'-carotenol, mas o seu produto de redução coincidiu com o β -apo-8'-carotenol (FIGURA 17).

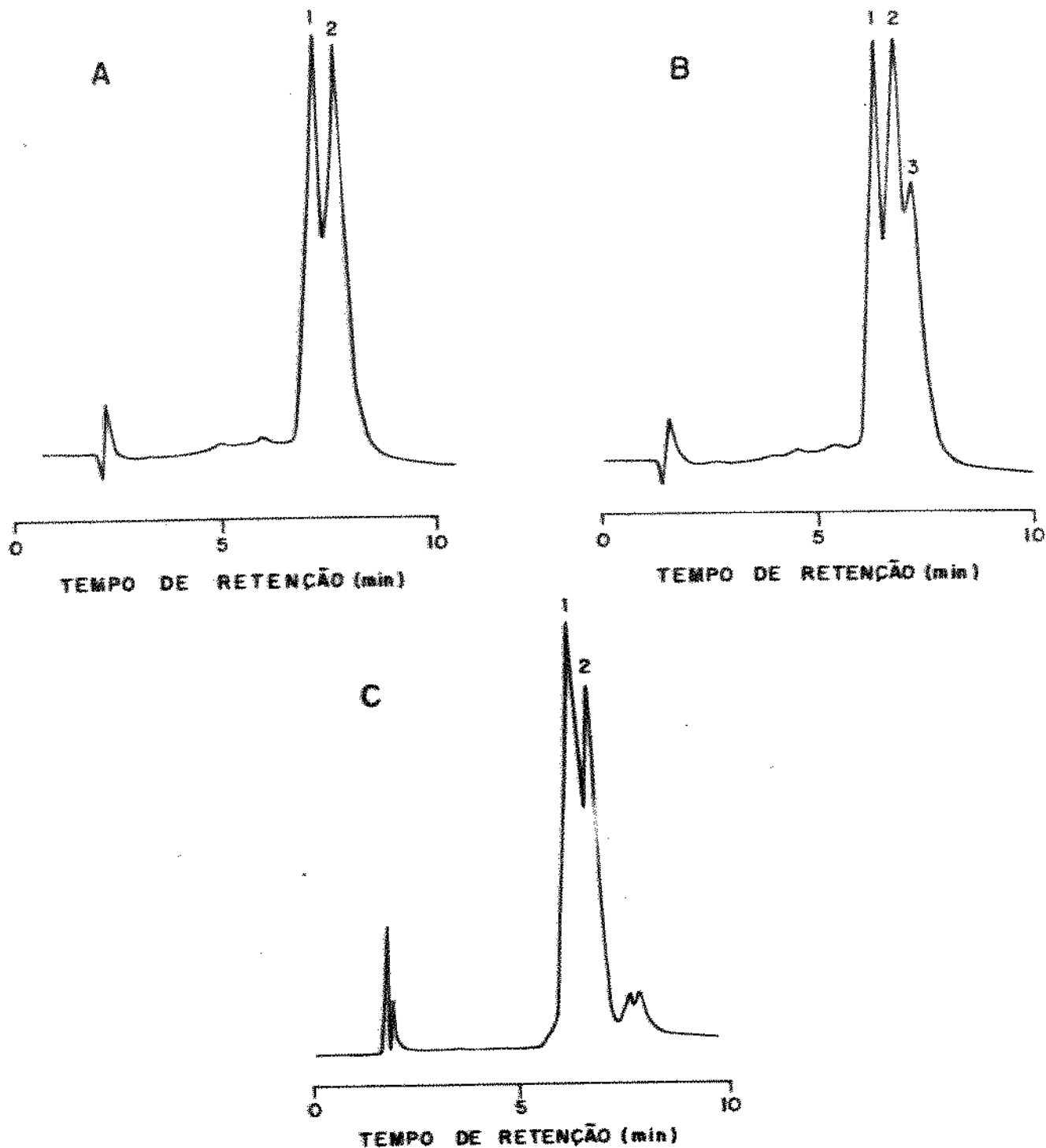


FIGURA 17: Cromatogramas obtidos por CLAE: (A) frações de β -apo-8'-carotenol (1) e β -apo-10'-carotenol (2) do abricô; (B) frações de β -apo-8'-carotenol (1) e β -apo-10'-carotenol (2) do abricô e padrão sintético de β -apo-8'-carotenol (3); (C) fração de β -apo-8'-carotenol do abricô + produto de redução do padrão de β -apo-8'-carotenol (1) e β -apo-10'-carotenol (2) do abricô.

5.6. Composição de Carotenóides do Buriti (*Mauritia vinifera*)

O buriti digno de aproveitamento econômico no estado selvagem, e mais ainda quando racionalmente melhorado e cultivado, se encontra abandonado, tendo o seu aproveitamento atual restringido aos interesses domésticos das populações locais. É encontrado principalmente na região norte, como também em extensas áreas do Brasil central.

Nove pigmentos foram detectados nas amostras analisadas de buriti: 13-cis- α -caroteno, α -caroteno, 13-cis- β -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, ζ -caroteno, β -zeacaroteno, γ -caroteno e zeaxantina. As estruturas e os espectros de absorção desses carotenóides estão nos ANEXOS 1 a 8, e as principais características na TABELA 24.

Com exceção da zeaxantina, todos os pigmentos foram identificados como carotenos, concordando com o resultado da triagem. A ausência de grupos substituintes foi confirmada pela ordem de eluição na coluna, bem como pelo comportamento na camada delgada de sílica gel desenvolvida com 3% de metanol em benzeno, onde as frações eluíram junto com a frente do solvente. Os isômeros *cis-trans* foram identificados da mesma forma descrita anteriormente.

A única xantofila presente tinha espectro de absorção idêntico ao do β -caroteno. A ordem de eluição na coluna e o valor de R_f da camada delgada (0,11) foram característicos de pigmento di-hidroxiado. A resposta positiva à acetilação e negativa à metilação confirmaram hidroxilas na posição não alílica. A partir da avaliação conjunta desses parâmetros, chegou-se a identificação do pigmento como sendo a zeaxantina.

A TABELA 25 apresenta a composição quantitativa dos carotenóides do buriti. As determinações feitas, embora não mostrassem variação qualitativa dos pigmentos, mostraram uma moderada variação quantitativa, provavelmente, devido ao estágio

TABELA 24: Principais características dos carotenóides do buriti.

Pigmentos	λ max (nm) ^a				A ^{1%} 1cm ^b	Atividade de Pró-vit. A (%) ^c	Valor de Rf Camada Delgada	Reações Químicas
13-cis- α -caroteno	420	441	469	2800		ativo	0,98	cis +
α -caroteno	422	444	472	2800		50	0,98	trans +
13-cis- β -caroteno	(422)	445	474	1730		53	0,97	cis +
β -caroteno	(424)	449	475	2592		100	0,99	trans +
9-cis- β -caroteno	(420)	444	470	2370		38	0,97	cis +
ζ -caroteno	380	400	442	2555		-	0,96	trans +
β -zeacaroteno	404	426	452	2520		20 - 40	0,96	trans +
γ -caroteno	435	460	491	3100		42 - 50	0,97	trans +
zeaxantina	(424)	448	474	2350		-	0,11	acet. +

^aMáximos de absorção em éter de petróleo

^bValores tabelados por DAVIES (1976) e obtidos neste trabalho

^cZECHMEISTER (1962) e BAUERNFEIND (1972)

TABELA 25: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A do buriti.

Pigmentos	Intervalo	Média \pm DP ^a	%
13-cis- α -caroteno	ND - 3,9	1,5 \pm 1,4	0,3
α -caroteno	70,0 - 90,5	80,1 \pm 9,1	15,6
13-cis- β -caroteno	ND - 7,5	3,8 \pm 2,9	0,7
β -caroteno	334,8 - 398,1	359,8 \pm 32,5	70,2
9-cis- β -caroteno	ND - 1,2	0,7 \pm 0,5	0,1
ζ -caroteno	4,0 - 5,2	4,6 \pm 0,5	0,9
β -zeacaroteno	3,7 - 6,8	5,4 \pm 1,5	1,1
γ -caroteno	32,4 - 41,9	36,8 \pm 4,5	7,2
zeaxantina	14,6 - 25,2	20,1 \pm 4,3	3,9
total	440,6 - 514,7	512,8 \pm 30,5	
valor de vitamina A (RE/100g)	6231 - 7174	6489 \pm 462	

^aMédia e desvio padrão de 5 determinações em duplicata
ND-não detectado.

de maturação em que os frutos foram colhidos. Sabe-se que frutos do mesmo cacho apresentam grande variação do estágio de maturação. Normalmente o fruto só é apanhado quando cai do pé, o que é indicativo da maturação, mas não há um controle rígido e muitas vezes os frutos são arrancados dos cachos, tendo seu grau de maturação estabelecido apenas visualmente.

O principal carotenóide encontrado foi o β -caroteno, sendo detectado em quantidades substanciais, numa faixa de 334,8 a 398,1 $\mu\text{g/g}$, representando em média 70% dos carotenóides totais. O α -caroteno foi o segundo principal pigmento, representando cerca de 16% dos carotenóides (70,0 a 90,5 $\mu\text{g/g}$).

Com um valor de vitamina A de 6.489 RE/100g, o buriti é uma das maiores, se não a maior fonte de pró-vitamina A. A FIGURA 18 mostra com mais clareza a potencialidade do buriti quando comparado com outras fontes consideradas ricas em pró-vitamina A.

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho contendo a composição de carotenóides do buriti, impossibilitando dessa forma uma comparação direta entre resultados. Há pouquíssimos dados a respeito do óleo de buriti, apresentando apenas o conteúdo total de carotenóides, erroneamente denominado de β -caroteno (PEIXOTO, 1973). O valor relatado de 3.000 $\mu\text{g/g}$ (50.000 RE/100g) é demasiadamente alto, mesmo para uma fonte riquíssima em β -caroteno.

Utilizou-se também a CLAE para a obtenção do perfil da composição de carotenóides, nas mesmas condições descritas para as outras frutas. Mesmo sem quantificar, o cromatograma obtido por CLAE confirmou a predominância do β -caroteno, seguido de longe de α -caroteno.

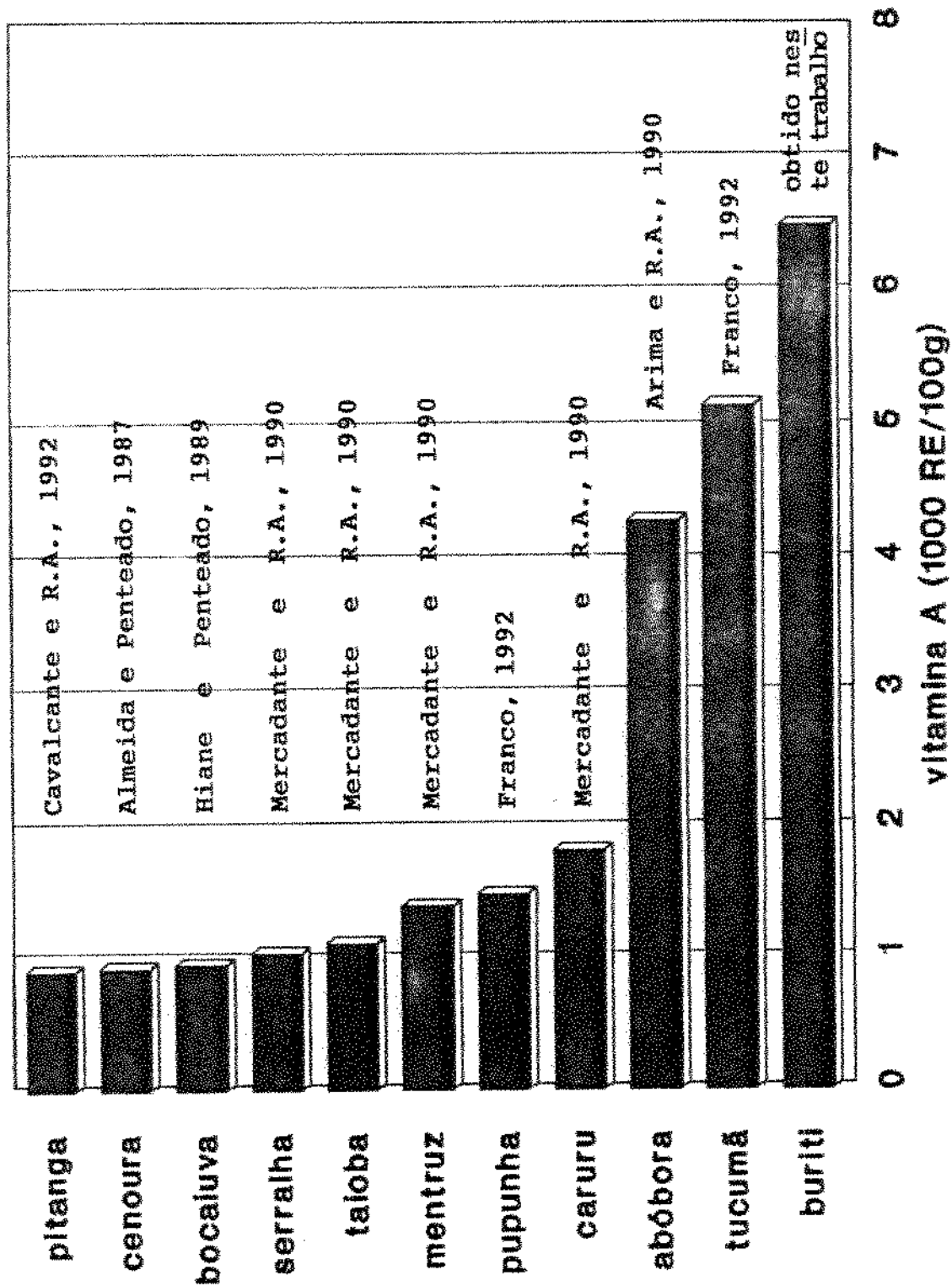


FIGURA 18: Comparação dos valores de vitamina A entre algumas fontes ricas em pró-vitaminas A.

5.7. Composição de Carotenóides de Pegui (*Caryocar villosium*)

No Brasil há duas espécies de peguizeiros que merecem destaque, o *Caryocar villosium*, que se desenvolve principalmente no norte-nordeste do país, e o *Caryocar brasiliense*, da região centro-oeste (HERINGE, 1962; MIRANDA, 1986). O seu fruto possui substancioso alimento que é empregado, à semelhança do dendê, no preparo de dois tipos de óleo, um extraído da polpa e outro da amêndoa. Entretanto, é essa polpa amarela, que envolve o caroço, o produto mais significativo da planta, sobretudo, por representar um dos poucos recursos alimentares da população subnutrida moradora das áreas de ocorrência do pegui. A frutificação ocorre geralmente nos meses de janeiro a março.

Sobre o valor vitamínico existem poucos dados e alguns bastante duvidosos, que colocam o pegui como uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A. Além disso, na maioria dos trabalhos a espécie estudada não é identificada (DIAS da SILVA, 1939; PECHINIK & GUIMARÃES, 1957; HERINGE, 1962).

No presente trabalho, foi analisada a espécie *villosium* e foram encontrados e identificados sete pigmentos: α -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina e zeaxantina. A composição de carotenóides, novamente, concorda com o resultado da triagem. As estruturas e os espectros de absorção estão nos ANEXOS 1 a 8. Na TABELA 26 estão as principais características dos carotenóides identificados.

A identificação dos pigmentos do pegui seguiu os mesmos parâmetros descritos anteriormente para as outras frutas. A composição quantitativa está apresentada na TABELA 27. O principal pigmento foi a zeaxantina (que não apresenta ação pró-vitamínica A) com um teor médio de 7,8 $\mu\text{g/g}$, representando 56% do total de carotenóides. A β -criptoxantina foi o segundo principal

TABELA 26: Principais características dos carotenóides de pequi.

Pigmentos	λ máx. (nm) ^a			A ^{1%} D ^{1cm}	Atividade de Pró-vit. A (%) ^c	Valor de Rf Camada Delgada	Reações Químicas
α -caroteno	422	444	472	2800	50	0,97	trans +
13-cis- β -caroteno	(422)	447	472	1730	53	0,99	cis +
β -caroteno	(424)	449	475	2592	100	0,99	trans +
ζ -caroteno	378	397	424	2555	-	0,96	trans +
neo- β -criptoxantina	(421)	444	472	2150	27	0,48	cis +
β -criptoxantina	(424)	447	474	2386	57	0,51	acet +
zeaxantina	(423)	447	474	2336	-	0,11	acet. +

^aMáximos de absorção em éter de petróleo; parênteses significam um ombro no lugar de pico

^bDados tabelados por DAVIES (1976) e determinados neste trabalho

^cZECHMEISTER (1962) e BAUERNFEIND (1972)

TABELA 27: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de pequi.

pigmentos	intervalo	MD+SD ^a	%
α -caroteno	tr - 0,1	0,1 + 0,1	0,6
13-cis- β -caroteno	ND - tr	-	-
β -caroteno	0,5 - 2,0	1,2 + 0,5	8,1
ζ -caroteno	0,2 - 0,9	0,5 + 0,3	3,3
neo- β -criptoxantina	ND - 1,2	0,4 + 0,2	2,9
β -criptoxantina	3,4 - 4,8	4,4 + 0,9	30,6
zeaxantina	6,9 - 9,3	7,8 + 1,2	55,5
total	11,6 - 14,7	13,5 + 1,3	
valor de vit. A (RE/100g)	53,0 - 68,6	65,0 + 9,5	

^a Média e desvio padrão de 5 determinações em duplicata

ND - não detectado

tr - traços

pigmento seguida do β -caroteno, com teores médio de 4,4 $\mu\text{g/g}$ (31%) e 1,2 $\mu\text{g/g}$ (8%), respectivamente.

O valor de vitamina A calculado através dos pigmentos pró-vitamínicos foi de 65 RE/100g, o que contradiz os poucos resultados encontrados na literatura que caracterizam o pequi, independente da espécie, como uma fonte rica em pró-vitamina A.

Cabe salientar que, com exceção do ζ -caroteno, todos os pigmentos identificados no pequi apresentam os máximos de absorção praticamente nos mesmos comprimentos de onda do β -caroteno (TABELA 26). Isso pode levar a uma grande superestimação do valor vitamínico, se para o cálculo deste levarmos em consideração a leitura do extrato total, como foi feito nos trabalhos encontrados na literatura.

Nenhuma das frutas brasileiras já analisadas, com exceção de pêssego, nectarina e buriti, acusou a presença de zeaxantina e, principalmente, em grande quantidade. Tal fato fez com que os principais pigmentos do pequi merecessem uma identificação mais aprimorada. Assim, foram obtidos os espectros de massa das frações de β -criptoxantina e zeaxantina.

O espectro de massa apresentado na FIGURA 19 mostra um sinal intenso correspondente ao ion molecular M/Z 552, o que corresponde a uma fórmula mínima $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}$. Um fragmento característico a M/Z 534 (M-18, H_2O) confirmou a presença de hidroxila. A ausência de outros fragmentos característicos concordam com a identificação da β -criptoxantina. Na FIGURA 20, o ion molecular M/Z 568 corresponde a uma fórmula mínima $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$. Dois fragmentos característicos, uma a M/Z 550 (M-18, H_2O) e outro intenso a M/Z 532 (M-18-18, 2 H_2O) confirmam a presença de duas hidroxilas na molécula. Para maior segurança, os espectros de massa dos pigmentos isolados foram comparados aos de padrões de β -criptoxantina e zeaxantina obtidos sob as mesmas condições, confirmando dessa forma a identificação dos pigmentos.

O perfil do cromatograma obtido por CLAE (FIGURA 21), utilizando o mesmo sistema cromatográfico descrito anteriormente, ilustra ainda mais a composição atípica da fruta.

5.8. Composição de Carotenóides de Nêspera (*Eriobotrya japonica*)

A importância da nêspera no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos. Sua safra (maio-outubro) coincide com a escassez de outras frutas no mercado. A nêspera brasileira tem encontrado grande aceitação no mercado internacional, e sua exportação tem aumentado a cada ano.

O perfil em carotenóides de nêspera ficou assim definido: 13-cis- β -caroteno; β -caroteno; ζ -caroteno; neurosporeno; β -criptoxantina; 5,6-epoxi- β -criptoxantina; violaxantina; auroxantina e neoxantina. A composição concorda mais uma vez com a triagem. As propriedades desses pigmentos estão apresentadas na TABELA 28. As estruturas e os espectros de absorção estão nos ANEXOS 1 a 8.

O neurosporeno foi identificado através do perfil e dos máximos de absorção. O valor de Rf de 0,91 na camada delgada indicou a ausência de substituintes e a forma *trans* foi confirmada pelo deslocamento hipsocrômico de 4 nm após a reação catalisada por iodo.

A fração que eluiu da coluna a seguir, apresentou um valor de Rf indicativo da presença de um grupo substituinte, confirmado como uma hidroxila pela resposta positiva à acetilação. A reação de metilação foi necessária para indicar a posição, sendo que a resposta negativa confirmou a posição não alílica, compatível com a estrutura de β -criptoxantina. A fração

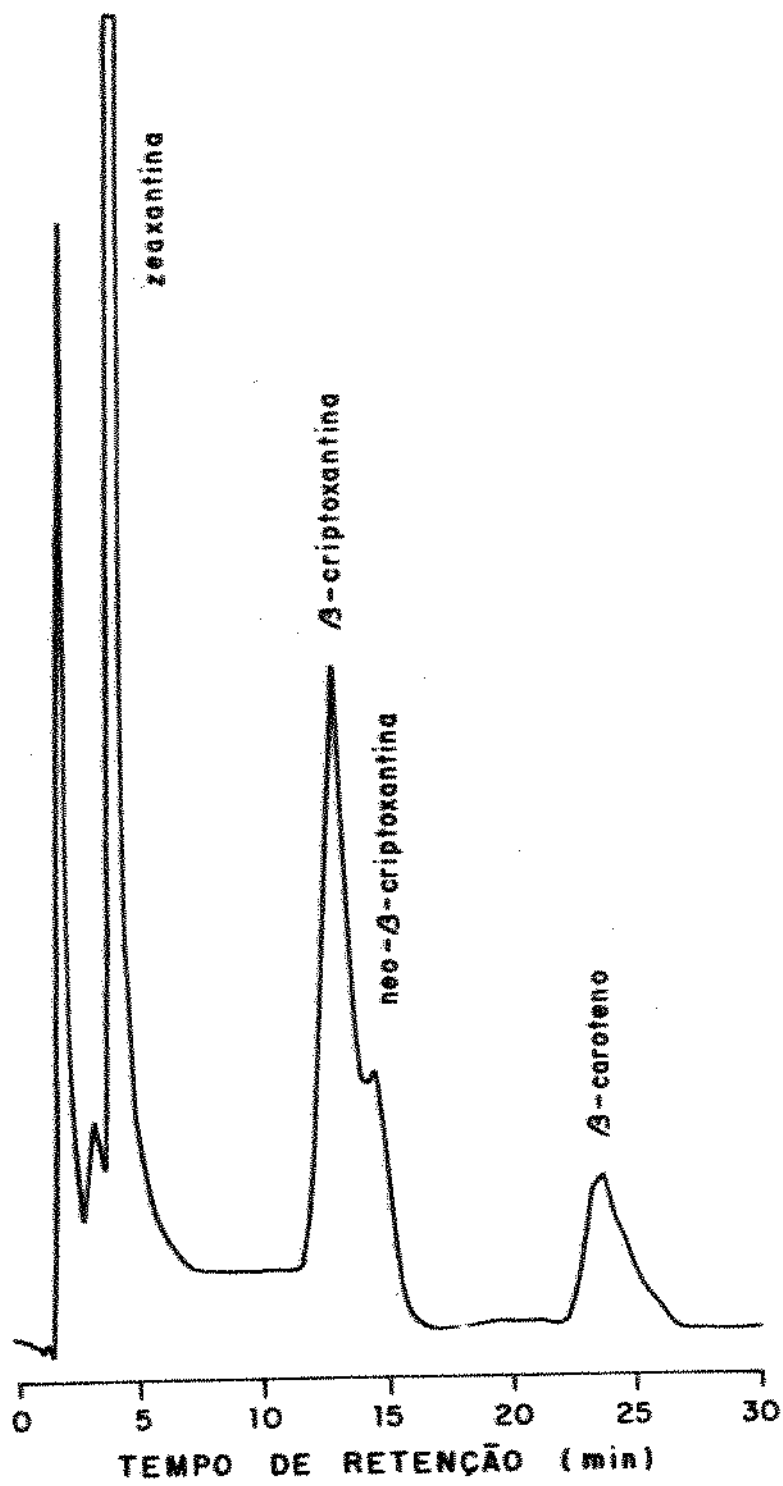


FIGURA 21: Cromatograma obtido por CLAE do extrato total de piqui.

TABELA 28: Principais características dos carotenóides da nêspera

pigmentos	λ máx (nm) ^a	$A^{1\%}$ 1cm			atividade pró-vitamina Rf (%)	reação química	
13-cis- β -caroteno	(422)	446	472	1730	53	0,98	cis +
β -caroteno	(424)	449	477	2592	100	0,99	trans +
ζ -caroteno	380	400	425	2555	-	0,97	trans +
neurosporeno	420	442	472	2918	-	0,95	trans +
β -criptoxantina	(423)	447	477	2386	57	0,49	acet +
5,6-epoxi- β -criptoxantina	420	444	472	2386	50	0,45	acet + epox +
violaxantina	418	441	468	2550	-	0,11	acet + epox +
auroxantina	382	400	425	2592	-	0,09	acet + epox +
neoxantina	412	438	468	2243	-	0,02	acet + epox +

^a Máximos de absorção em éter de petróleo; parênteses significam um ombro no lugar de pico

^b valores tabelados por DAVIES (1976) e obtidos neste trabalho

^c ZECHMEISTER (1962) e BAUERNFEIND (1972)

seguinte apresentou, praticamente, as mesmas características, mas quando a mancha na placa de sílica gel foi exposta a vapores de HCl ocorreu mudança na coloração para azul. Com a adição de HCl 0,1N à solução etanólica do pigmento observou-se um deslocamento hipsocrômico de 20 nm, confirmando a presença de um grupo epóxido do tipo 5,6. Todas as propriedades concordaram, portanto, com a identificação do 5,6-epoxi- β -criptoxantina.

A última fração após desenvolvimento na camada delgada de sílica gel, desenvolvida com 3% de metanol em benzeno, praticamente não se deslocou do ponto de aplicação, um indicativo da presença de três hidroxilas, confirmada pela resposta positiva à acetilação. Quando submetida a vapores de HCl a mancha na placa tornou-se azul. Com a adição de gotas de HCl 0,1N o pigmento exibiu efeito hipsocrômico de 20 nm, indicando a presença de um grupo 5,6-epóxido. Pela análise desses parâmetros e pelo espectro de absorção, a fração foi identificada como sendo neoxantina.

Em termos quantitativos (TABELA 29) o que existe é a predominância do β -caroteno (8,0 $\mu\text{g/g}$) e da β -criptoxantina (4,5 $\mu\text{g/g}$), sendo encontrados traços de 13-*cis*- β -caroteno em apenas duas amostras. O valor de vitamina A de 179 RE/100g é quase que exclusivamente devido a contribuição desses dois carotenóides.

Na TABELA 30 a composição de carotenóides está apresentada em % para permitir uma comparação direta com os dados da composição de nêsperas de Israel (GROSS et alii, 1973) e do Japão (KOBAYASHI et alii, 1978). Em ambos os estudos o número de amostras não foi especificado e os desvios padrão não foram apresentados, impossibilitando dessa forma uma idéia da variação entre as amostras. Em termos quali e quantitativo há uma semelhança muito grande entre a cultivar brasileira analisada (Mizuho) e a japonesa (Tanaka), especialmente em termos de β -caroteno, β -criptoxantina e violaxantina. Segundo OJIMA & KIGITANO (1978), as principais variedades plantadas no Brasil são Mizuho e Precoce, que são produtos do cruzamento entre as variedades japonesas Kusunoki x Tanaka e Mogi x Tanaka,

TABELA 29: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A da nêspera

pigmentos	intervalo	MD + DP ^a
13-cis- β -caroteno	ND - tr	-
β -caroteno	7,4 - 8,3	8,0 + 0,6
ζ -caroteno	0,1 - 0,2	0,1 + 0,1
neurosporeno	0,9 - 1,5	1,1 + 0,3
β -criptoxantina	4,6 - 5,0	4,5 + 0,5
5,6-epoxi- β -criptoxantina	0,3 - 0,9	0,6 + 0,2
violaxantina	1,5 - 1,7	1,6 + 0,1
auroxantina	0,8 - 1,0	0,9 + 0,1
neoxantina	0,6 - 0,9	0,8 + 0,1
total	16,9 - 18,2	17,7 + 0,2
valor de vitamina A (RE/100g)	166 - 189	179 + 12

^a Média e desvio padrão de 5 determinações em duplicata

ND - não detectado

tr - traços

TABELA 30: Comparação da composição de carotenóides de nêspera plantada no Brasil, em Israel e no Japão.

carotenóides	% dos carotenóides totais			
	Brasil cv Mizuho	Israel ^a cv "Golden Nugget"	Japão ^b cv Mogi	Japão ^b cv Tanaka
cis-neo- β -caroteno		5,0		
β -caroteno	44,6	33,0	30,0	42,0
ζ -caroteno	0,7			
α -caroteno		6,1		
neurosporeno	6,2			
mutatocromo		1,4		
5,6-epoxi- β -criptoxantina	3,5	2,8		
5,6,5',6'-diepoxi- β -crip- toxantina	2,2	13,0	7,0	
β -criptoxantina	27,3	22,0	33,0	31,0
criptoflavina		1,6		
luteína		3,2		
cis-luteína		0,7		
isoluteína		1,7		
violaxantina	8,8	2,9	8,0	8,0
crisantemaxantina		0,9		
luteoxantina		1,4		
neocromo		1,0		
neoxantina	4,3	4,9		
auroxantina	4,9			
Total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)	17,6	22,0	17,0	21,0
Vitamina A (RE/100g)	179	210	180	236

a GROSS et alii (1973)

b KOBAYASHI et alii (1978)

respectivamente, o que explica tal semelhança. As nêspersas israelenses apresentaram uma composição de carotenóides diferente, embora o β -caroteno e a β -criptoxantina fossem também os carotenóides majoritários.

O conteúdo total de carotenóides e o valor de vitamina A da fruta brasileira (17,6 $\mu\text{g/g}$ e 179 RE/100g) foram similar ao da fruta japonesa (17,0 $\mu\text{g/g}$ e 180 RE/100g) e um pouco menor ao da fruta israelense (22,0 $\mu\text{g/g}$ e 210 RE/100g).

O perfil cromatográfico obtido por CLAE, mais uma vez, confirma os dados da cromatografia de coluna aberta, com relação à composição dos principais pigmentos.

5.9. Composição de Carotenóides de Pêssego (*Prunus persica*)

Ao contrário das frutas tropicais, muitas das quais ricas em carotenóides, as frutas de clima temperado são normalmente ricas em antocianinas e pobres em carotenóides. Praticamente as únicas frutas carotenogênicas de clima temperado são pêssego, nectarina e damasco. Sendo assim, pêssego tem sido uma das frutas mais estudadas em termos de carotenóides, no entanto, a sua composição ainda não está bem estabelecida.

No Brasil, pêssego e nectarina são basicamente as únicas frutas fontes de pró-vitamina A do sul do país, o que justificou a sua inclusão neste estudo.

O perfil em carotenóides para os dois tipos de pêssego (cultivar Diamante e uma variedade chilena) estudados foi muito semelhante, ficando assim definido: 13-cis- β -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina, luteoxantina e

auroxantina. A luteína e a zeaxantina só foram detectadas na variedade chilena, enquanto que a luteoxantina só no cultivar Diamante, embora o resultado da triagem tenha sido idêntico para ambos. As estruturas e os espectros de absorção são encontrados nos ANEXOS 1 a 8. Na TABELA 31 estão resumidas as principais características dos pigmentos identificados. A identificação dos pigmentos seguiu os mesmos moldes anteriores.

Em relação aos teores de carotenóides (TABELA 32) a β -criptoxantina foi o carotenóide predominante tanto para o pêssego Diamante (4,1 $\mu\text{g/g}$) como para o chileno (5,1 $\mu\text{g/g}$). Em todas as amostras analisadas foram encontrados isômeros do β -caroteno e da β -criptoxantina. O valor médio de vitamina A calculado foi de 55 RE/100g para o pêssego Diamante e 73 RE/100g para a variedade chilena. Tais resultados estão coerentes com o apresentado por TAVARES (1991), mas discordantes dos dados apresentados por BUREAU & BUSWAY (1986) (4,35 e 29,72 RE/100g). Essa discrepância pode ser devida, pelo menos em parte, ao fato de que os últimos autores não realizaram a saponificação e, portanto a maior parte dos ésteres da β -criptoxantina não foram quantificados.

Na TABELA 33 temos uma comparação dos teores de carotenóides de pêssego encontrados na literatura. Em pêssegos cultivar Halford e Redhaven maduros (CURL, 1959 e GROSS, 1979, respectivamente) o principal pigmento encontrado foi a violaxantina. O α -caroteno, presente em pêssegos analisados por MACKINNEY (1937) e McCARTY & LESLEY (1954), identificado e quantificado por BUREAU & BUSHWAY (1986) não foi encontrado nas amostras analisadas neste trabalho. A composição de carotenóides determinada por TAVARES (1991) para o pêssego cultivar Rei da Conserva é muito semelhante a do pêssego chileno, no entanto é um pouco discordante da composição do pêssego Diamante onde há ausência de luteína e zeaxantina, e presença de auroxantina e luteoxantina.

GEBHART *et alii* (1977), QUACKENBUSH (1987), KHACHIK (1989) e TAVARES (1991) observaram a presença de *cis* -

TABELA 31: Principais características dos carotenóides de pêssego cultivar Diamante e de uma variedade chilena.

Pigmentos	λ máx (nm) ^a			A _{1%} ^b 1cm	Atividade de Pró-vit. A (%) ^c	Valor de Rf Camada Delgada	Reações Químicas
13-cis- β -caroteno	(422)	444	472	1730	53	0,97	cis +
β -caroteno	(424)	449	474	2592	100	0,99	trans +
9-cis- β -caroteno	(420)	445	473	2370	38	0,98	cis +
ζ -caroteno	378	398	424	2555	-	0,97	trans +
neo- β -criptoxantina	(423)	447	472	2386	50	0,49	acet + cis +
β -criptoxantina	(424)	448	474	2386	57	0,50	acet +
luteína	423	448	474	2350	-	0,21	met + acet +
zeaxantina	(422)	446	473	2350	-	0,12	acet. +
violaxantina	418	444	468	2550	-	0,11	acet + epox +
luteoxantina	400	423	447	2592	-	0,09	acet + epox +
auroxantina	382	402	426	1850	-	0,09	acet + epox +

^aMáximos de absorção em éter de petróleo; parênteses significam um ombro no lugar de pico

^bDados tabelados por DAVIES (1976) e obtidos neste trabalho

^cZECHMEISTER (1962) e BAUERNFEIND (1972)

TABELA 32: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de pêssego cultivar Diamante e de uma variedade de pêssego chileno.

pigmentos	cultivar Diamante		variedade chilena	
	intervalo	M \pm DP	intervalo	M \pm DP
13-cis- β -caroteno	tr - 0,2	0,2 \pm 0,1	tr - 0,4	0,2 \pm 0,1
β -caroteno	0,5 - 0,8	0,6 \pm 0,2	0,9 - 1,4	1,2 \pm 0,2
9-cis- β -caroteno	tr - 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 - 0,2	0,1 \pm 0,1
ζ -caroteno	0,1 - 0,3	0,2 \pm 0,1	tr - 0,2	0,2 \pm 0,1
neo- β -criptoxantina	0,2 - 0,4	0,2 \pm 0,1	0,2 - 0,6	0,3 \pm 0,2
β -criptoxantina	3,1 - 4,6	4,1 \pm 0,8	4,9 - 8,7	5,1 \pm 1,5
luteína	ND	-	1,9 - 2,6	2,2 \pm 0,4
zeaxantina	ND	-	tr - 0,5	0,2 \pm 0,2
violaxantina	0,6 - 1,2	0,9 \pm 0,4	1,0 - 1,8	1,6 \pm 0,4
luteoxantina	0,3 - 0,9	0,7 \pm 0,3	ND	-
auroxantina	tr - 0,4	0,2 \pm 0,2	0,5 - 1,2	0,8 \pm 0,4
total	4,2 - 8,1	5,5 \pm 2,4	9,1 - 15,2	11,9 \pm 3,1
valor de vitamina A (RE/100g)	48 - 64	55 \pm 8	65 - 80	73 \pm 6

^a média e desvio padrão de 5 determinações em duplicata

ND - não detectado

tr - traços

TABELA 33: Comparação dos teores de carotenóides de pêssego.

variedade	país	n ^o amostra	método	carotenóides (µg/g)	referência
Halford	USA	-	CCA	ζ-caroteno (0,03) β-caroteno (2,30) β-criptoxantina (2,97) violaxantina (7,02) persicaxantina (3,24) + 35 carotenóides com teores abaixo de 0,01	CURL, 1959 ^a
Clingstone	Austrália	1	CCA	13-cis-β-caroteno (0,14) β-caroteno (1,90) 9-cis-β-caroteno (0,21) β-criptoxantina (2,01)	GEBHARDT et alii, 1977
Redhaven	-	-	CCD	β-caroteno (0,2) zeaxantina (0,3) neoxantina (0,2) isoluteína (0,4) β-criptoxantina (0,7) violaxantina (1,6) + 33 carotenóides com teores abaixo de 0,1	GROSS, 1979
não especificado	USA	8	CLAE	α-caroteno (0,03) β-caroteno (0,77) β-criptoxantina (0,03)	BUREAU & BUSHWAY, 1986
não especificado	USA	-	CLAE	13-cis-β-caroteno (1,02) β-caroteno (3,05) 9-cis-β-caroteno (0,26)	QUACKENBUSH, 1987 ^a
Elberta	USA	-	CCA	β-caroteno (0,6) β-criptoxantina (0,5)	PHILIP & CHEN, 1988 ^b
		-	CLAE	β-caroteno (0,8) β-criptoxantina (0,5)	
Cling	USA	-	CCA	β-caroteno (2,1) β-criptoxantina (2,3)	
		-	CLAE	β-caroteno (2,2) β-criptoxantina (2,5)	

Yellow Elberta	USA	-	CLAE	13-cis- β -caroteno (0,30) β -caroteno (0,82) β -criptoxantina (0,03) éster β -criptoxantina (0,12) zeaxantina (0,04) éster zeaxantina (0,04) éster luteína (0,06)	KHACHIK et alii, 1989
Rei da Conserva	Brasil	3	CCA	13-cis- β -caroteno (0,2) β -caroteno (1,1) 9-cis- β -caroteno (0,1) neo- β -criptoxantina (0,4) β -criptoxantina (6,4) luteína (3,8) zeaxantina (1,5) violaxantina (0,8)	TAVARES, 1991

^a valores calculados segundo as porcentagens apresentadas.

isômeros do β -caroteno. Com exceção de TAVARES, em nenhum outro trabalho foi reportada a presença da neo- β -criptoxantina.

Os teores de β -criptoxantina, principal pigmento, dos pêssegos brasileiros são superiores aos dos pêssegos analisados no exterior. Embora saponificando as amostras CURL (1959), GEBHART et alii (1977), GROSS (1979) e PHILIP & CHEN (1988b) encontraram teores de β -criptoxantina inferiores aos nossos. BUREAU & BUSHWAY (1986) e KHACHIK et alii (1989) não saponificaram as amostras, o que justifica o baixo teor de β -criptoxantina encontrado.

Mesmo admitindo-se um certo grau de variabilidade inerente entre amostras, devido a fatores como diferença entre variedades, efeitos geográficos, condições de colheita e, principalmente no caso de frutas, o grau de maturação, a magnitude das variações apontam também erros devido aos métodos analíticos, como já observado anteriormente por RODRIGUEZ-AMAYA (1989).

5.10. Composição de Carotenóides de Nectarina (*Prunus persica*)

Os frutos maduros de nectarina apresentaram a seguinte composição: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina, mutatoxantina e auroxantina. Assim como nas outras frutas, o perfil determinado na triagem concorda com a identificação dos pigmentos. As estruturas e os espectros de absorção estão nos ANEXOS 1 a 8. As características dos pigmento identificados são apresentadas na TABELA 34.

TABELA 34: Principais características dos carotenóides de nectarina.

Pigmentos	λ max (nm) ^a	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ b		Atividade de Pró-vit. A (%) ^c	Valor de Rf Camada Delgada	Reações Químicas
13-cis- β -caroteno	(422) 443	472	1730	53	0,97	cis +
β -caroteno	(424) 448	474	2592	100	0,99	trans +
9-cis- β -caroteno	(420) 444	471	2370	38	0,97	cis +
ζ -caroteno	378 397	424	2555	-	0,96	trans +
não identificado	432		2592	-	0,68	trans +
neo- β -criptoxantina	(422) 446	472	2386	50	0,49	acet + cis +
β -criptoxantina	(424) 447	474	2386	57	0,51	acet +
luteína	423 448	474	2350	-	0,19	met + acet +
zeaxantina	(422) 446	472	2350	-	0,11	acet. +
violaxantina	418 444	468	2550	-	0,09	acet + epox +
mutatoxantina	400 426	447	2592	-	0,11	acet + epox +
auroxantina	382 402	426	1850	-	0,07	acet + epox +

^aMáximos de absorção em éter de petróleo; parênteses significam um ombro no lugar de pico

^bDados tabelados por DAVIES (1976) e obtidos neste trabalho

^cZECHMEISTER (1962) e BAUERNFEIND (1972)

A identificação foi feita de forma semelhante às descritas anteriormente. Um pigmento, que eluiu após o ζ -caroteno, apresentou um único máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ 432 nm em éter de petróleo; 443 nm em metanol) forma característica de cetocarotenóide, porém não respondeu à redução com NaBH_4 . A resposta negativa à acetilação mostrou que o composto não apresentava hidroxilas e após exposição a vapores de HCl não ocorreu mudança na coloração da mancha, indicando a ausência de grupo epóxido. Embora não tenha sido possível a sua identificação, nem por espectrometria de massa devido à pequena quantidade, uma estimativa da concentração foi feita baseada na absortividade do β -caroteno.

O principal pigmento encontrado foi a β -criptoxantina, representando 41% do conteúdo total de carotenóides (9,6 $\mu\text{g/g}$) (TABELA 35). Dos pigmentos encontrados na nectarina, são precursores de vitamina A o β -caroteno, a β -criptoxantina e as formas isoméricas de ambos. Embora a soma desses pigmentos representasse 55% do total de carotenóides, o valor de vitamina A foi de apenas 54 RE/100g devido a baixa concentração de carotenóides observada nesta fruta.

TABELA 35: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A de nectarina

pigmentos	intervalo	MD \pm DP ^a	%
13-cis- β -caroteno	ND - 0,2	0,1 \pm 0,1	0,9
β -caroteno	1,0 - 1,3	1,0 \pm 0,2	10,4
9-cis- β -caroteno	ND - 0,1	0,1 \pm 0,1	0,8
ζ -caroteno	0,1 - 0,2	0,2 \pm 0,1	2,1
não identificado	ND - 0,1	0,1 \pm 0,1	0,9
neocriptoxantina	0,2 - 0,6	0,3 \pm 0,2	3,1
β -criptoxantina	3,3 - 4,6	3,9 \pm 0,7	40,6
luteína	1,0 - 1,4	1,1 \pm 0,2	11,4
zeaxantina	1,1 - 2,0	1,6 \pm 0,3	16,7
violaxantina	0,5 - 0,9	0,8 \pm 0,1	8,3
mutatoxantina	ND - 0,1		
auroxantina	ND - 1,0	0,4 \pm 0,3	4,2
total	8,9 - 10,2	9,6 \pm 0,7	
valor de vitamina A (RE/100g)	48 - 60	54 \pm 5	

^a média e desvio padrão de 5 determinações em duplicata
 ND - não detectado

6. CONCLUSÕES

a. O método recomendado pelo IVACG, com pequenas modificações e o de RODRIGUEZ-AMAYA et alii simplificado demonstraram precisão e exatidão para a determinação de pró-vitaminas A. O método de COST91 não se mostrou satisfatório, necessitando várias modificações na maioria de suas etapas, desde a tomada da amostra até o processo cromatográfico.

b. Devido à variação observada nos valores encontrados na literatura, a confirmação dos coeficientes de absorção e o estabelecimento daqueles ainda não existentes devem ser continuados, já que são valores necessários para o cálculo da concentração de carotenóides e pró-vitaminas A.

c. Os isômeros são inexistentes ou ocorrem em quantidades muito pequenas em frutas "in natura". A separação das formas isoméricas, portanto, não é necessária para a determinação do valor de vitamina A. A quantificação de β -criptoxantina, raramente realizada no exterior, tem maior importância em muitas frutas.

d. Os isômeros ocorrem mais frequentemente e em concentrações maiores em hortaliças frescas e cozidas. Neste caso, a separação dos isômeros parece ser necessária para a determinação dos valores de vitamina A, desde que as biopotências sejam melhor estabelecidas

e. A triagem é uma boa técnica auxiliar na determinação da composição de carotenóides.

f. Em abricó, os carotenóides identificados foram: 13-cis- β -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, ζ -caroteno, β -zeacaroteno, β -apo-10'-carotenal, β -apo-8'-carotenol, violaxantina, luteoxantina e auroxantina.

g. No abricó foram observadas grandes variações na composição quantitativa, maiores mesmo que as encontradas normalmente em frutas. Violaxantina, β -caroteno ou β -apo-8'-carotenol alternam como principal pigmento.

h. A espectrometria de massa, juntamente com os parâmetros tradicionais, estabeleceram a estrutura de um novo carotenóide, o β -apo-8'-carotenol, no abricó.

i. Os carotenóides encontrados em buriti foram: 13-cis- α -caroteno, α -caroteno, 13-cis- β -caroteno, β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, ζ -caroteno, β -zeacaroteno, γ -caroteno e zeaxantina.

j. A composição em carotenóides, quase que exclusivamente carotenos pró-vitamínicos em quantidades elevadas, revela o buriti como uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A.

l. O pequi (*Cariocar villosium*) apresenta a seguinte composição em carotenóides: α -caroteno, 13-cis- β -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, β -criptoxantina, neo- β -criptoxantina e zeaxantina.

m. A composição de carotenóides do pequi é atípica, tendo a zeaxantina como principal pigmento, seguida da β -criptoxantina. O valor de vitamina A é baixo, ao contrário do afirmado na literatura.

n. Nove pigmentos foram identificados nos cinco lotes de nêspersas analisados: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -criptoxantina, 5,6-epoxi- β -criptoxantina, violaxantina, auroxantina e neoxantina.

o. A composição de carotenóides de nêspersas brasileiras é muito semelhante a das nêspersas japonesas, porém, diferem um pouco das israelenses, embora o β -caroteno e a β -criptoxantina sejam também os principais pigmentos.

p. Os carotenóides identificados no pêssego Diamante foram: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, violaxantina, auroxantina e luteoxantina. Os sete primeiros pigmentos são também encontrados na variedade chilena, além de luteína e zeaxantina.

q. Os pêssegos brasileiros mostram maiores teores de β -criptoxantina (principal pigmento) que os pêssegos analisados no exterior. Tal fato pode ser devido a diferença de variedade ou decorrente do procedimento analítico.

r. Em nectarina foram encontrados os carotenóides: 13-*cis*- β -caroteno, β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, ζ -caroteno, neo- β -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina, mutatoxantina, auroxantina e um pigmento não identificado.

s. A composição de carotenóides de nectarina mostrou-se muito semelhante à do pêssego, fato esperado já que essas frutas pertencem à mesma família.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.B. & PENTEADO, M.V.C. Carotenoids and provitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). *J. Food Comp. Anal.* 1: 341-52, 1988.
- ALMEIDA, L.B. & PENTEADO, M.V.C. Carotenóides e valor de provitamínico A da mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) consumida em São Paulo. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo* 23(1): 52-7, 1987a.
- ALMEIDA, L.B. & PENTEADO, M.V.C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A de cenouras (*Daucus carota* L.) comercializadas em São Paulo, Brasil. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo* 23(2): 133-41, 1987b.
- ARIMA, H.k. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. *J. Micronutr. Anal.* 4: 177-91, 1988.
- ARIMA, H.K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and pumpkin from northeastern Brazil. *Arch. Latino.* 40(2): 284-92, 1990.
- BALOGH, A.K.; BUCKLE, K.A.; EDWARDS, R.A. Separation of carrot carotenoids on hyflosupercel-magnesium oxide-calcium sulfate thin layers. *J. Chromat.* 139: 149-55, 1977.

- BARANYAI, M.; MATUS, Z.; SZABOLCS, J. Determination by HPLC, of carotenoids in paprika products. *Acta Alimentaria* 11: 309-23, 1982.
- BAUERNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors analogs in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* 20: 456-73, 1971.
- BAUERNFEIND, J.C.; ADAMS, C.R.; MARUSICH, W.L. Carotenes and other vitamin A precursors in animal feed. In: Bauernfeind, J.C. ed. *Carotenoids as Colorant and Vitamin A Precursors*. New York, Academic Press, 1972. cap. 6, p. 563-743.
- BAYFIELD, R.F.; BARRETT, J.D.; FALK, R.H. Determination of lipids in biological materials by chromatography. *J. Chromat.* 28: 363-70, 1967.
- BEECHER, G.R. & KHACHIK, F. Evaluation of vitamin A and carotenoid data in food composition tables. *J. Nat. Cancer Inst.* 73(6): 1397-402, 1984.
- BEN-AMOTZ, A.; LERS, A.; AVRON, M. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 86: 1286-91, 1988.
- BENDICK, A. Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.* 119: 112-115, 1989a.
- BENDICK, A. Symposium conclusions: biological action of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 1233-9, 1989b.

- BIACS, P.A.; DAOOD, H.G.; PAVISA, A.; HAJDU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L. Var. 52-20). *J. Agric. Food Chem.* 37: 350-3, 1989.
- BICKOFF, E.M.; ATKINS, M.E.; BAILEY, G.F.; STITT, F. Stereoisomeric analysis of beta-carotene. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 32: 766-74, 1949.
- BRITTON, G. General carotenoid methods. *Methods Enzymol.* 111 (13): 113-9, 1985.
- BRAUMAN, T. & GRIMME, L.H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* 637: 8-17, 1981.
- BROSSARD, J. & MACKINNEY, G. The carotenoids of *Diospyros kaki* (Japanese Persimmons). *J. Agric. Food Chem.* 11: 501-3, 1963.
- BRUBACHER, G.; MULLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. *Methods for the Determination of vitamins in Food*. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1985. cap. 3, p. 33-50.
- BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food Sci.* 51(1): 128-30, 1986.
- BUSHWAY, R.J. Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 409-12, 1986.

- BUSHWAY, R.J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 8: 1527-47, 1985.
- BUSHWAY, R.J. & WILSON, A.M. Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15(3): 165-9, 1982.
- BUSHWAY, R.J.; YANG, A.; YAMANI, A.M. Comparison of α - and β -carotene content of supermarket versus roadside stand produce. *J. Food Qual.* 9: 437-43, 1986.
- CANO, M.P.; FUSTER, C.; PRESTANO, G. Suitability to freezing of four spanish kiwifruit cultivars. In: *Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits and Vegetables*, International Institute of Refrigeration. Davis, University of Davis, 1991. p.262-67.
- CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparasion of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reverse-phase high performance liquid chromatography. *Chromatog.* 33(3): 133-7, 1992.
- CAVALCANTE, M.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: Charalambus, G. ed. *Food Science and Human Nutrition*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1992. p. 643-50.

- CECCHI, H.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *J. Food Sci.* 46(1): 147-9, 1981a.
- CECCHI, H.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. *Ciênc. Cultura* 33(1): 72-6, 1981b.
- CHANDLER, L.A. & SCHWARTZ, S.J. HPLC separation of *cis-trans* isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 52: 669-72, 1987.
- CHANDLER, L.A. & SCHWARTZ, S.J. Isomerization and losses of *trans-β-carotene* in sweet potatoes as affected by processing treatments. *J. Agric. Food Chem.* 36: 129-33, 1988.
- CHEN, B.H. & YANG, S.H. An improved analytical method for the determination of carotenes and xantophylls in dried plant materials and mixed feeds. *Food Chemistry* 44: 61-6, 1992.
- COLDITZ, G.A.; BRANCH, L.G.; LIPNICK, R.J.; WILLET, W.C.; ROSNER, B.; POSNER, B.M.; HENNEKENS, C.H. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 32-6, 1985.
- CRAFT, N.E.; SANDER, L.C.; PIERSON, H.F. Separation and Relative Distribution of all-*trans-β-carotene* and *cis* Isomers in *β-Carotene* Preparations. *J. Micronutr. Anal.* 8: 209-21, 1990.

- CRAFT, N.E. & SOARES, J.H.Jr. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *Helv. Chim. Acta* 69(2): 537-41, 1992.
- CURL, A.L. The carotenoids of cling peaches. *Food Res.* 24: 413-21, 1959.
- CURL, A.L. The carotenoids of red bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* 10: 504-9, 1962.
- CURL, A.L. The carotenoids of green bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* 12: 522-4, 1964.
- CURL, A.L. Apo-10'-violaxanthal, a new carotenoid from valencia orange peels. *J. Food Sci.* 32: 141-3, 1967.
- DAOOD, H.G.; BIACS, P.A.; PAVISA, A.; HAJDU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L. Var. 52-20). *J. Agric. Food Chem.* 37: 350-3, 1989.
- DAVIES, B.H. Carotenoids. In Goodwin, T.W., ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2nd ed., London, Academic Press, 1976. v.2, cap. 19, p. 38-165.
- DEAN, R.B. & DIXON, W.J. Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal. Chem.* 23: 636-42, 1951.
- DE RITTER, E. & PURCELL, A.E. Carotenoid analytical methods. In: Bauerfeind, J.C., ed. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, London, Academic Press, 1981, p. 815-923.

DEUEL, H.J.Jr.; JOHNSTON, C.; MESERVE, E.R.; POLGAR, A.; ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity IV. Neo- β -carotene B and neo- β -carotene U. *Arch. Biochem.* 7: 247-52, 1945.

DEUEL, H.J.Jr.; JOHNSTON, C.; SUMMER, E.; POLGAR, A.; ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity I. All-trans- β -carotene and neo- β -carotene-U. *Arch. Biochem.* 5: 107-14, 1944.

DEUEL, H.J.Jr.; MESERVE, E.R.; SANDOVAL, A.; ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity V. Neocryptoxanthin A. *Arch. Biochem.* 10: 491-52, 1946.

DEUTSCH, M.J. Vitamins and other nutrients. In Helrich, K. ed., *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists-AOAC*. 15th ed., Arlington, 1990, vol 2, p. 834-6.

DIAS da SILVA, R. Piqui-contribuição ao conhecimento das plantas úteis do Brasil. Em CONGRESSO BRASILEIRO de FARMÁCIA, 3., Belo Horizonte, 1939. *Anais Belo Horizonte*, 1939, p. 661-5.

EDWARDS, C.G. & LEE, C.Y. Measurement of provitamin A carotenoids in fresh and canned carrots and green peas. *J. Food Sci.* 51(2): 534-5, 1986.

EITENMILLER, R.R. Strengths and weakness of assessing vitamin content of foods. *J. Food Quality* 13: 7-10, 1989.

- ESKINS, K.; SCHOLFIELD, C.R.; DUTTON, H.J. High performance liquid chromatography of plant pigments. *J. Chromatog.* 135: 217-21, 1977.
- FISHER, C. & KOCIS, J.A. Separation of paprika pigments by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 35: 55-9, 1987.
- FRANCO, G. *Nutrição: texto básico e tabela de composição química de alimentos*, 7 ed., Rio de Janeiro, Edições Ateneu, 1992, p. 242.
- GEBHARDT, S.E.; ELKINS, E.R.; HUMPHREY, J. Comparasion of two methods for determining the vitamin A value of clingstone peaches. *J. Agric. Food Chem.* 25: 629-32, 1977.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22: 104-6, 1989.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. *Int. J. Food Sci. Technol.* 22: 451-60, 1987.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mudança na composição de carotenóide e valor de vitamina A durante processamento e estocagem de mamão (*Carica papaya*) *Cienc. Technol. Alim.* 11(2): 210-20, 1991.

- GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CONNOR, A.E.; BRITTON, G. Confirmation of the structure of papaya β -cryptoxanthin monoepoxide. *Food Chem.* 36: 281-6, 1990.
- GOODWIN, T.W. Distribution of carotenoids. In: Goodwin, T.W., ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2nd ed., London, Academic Press, 1976, v.1, cap. 4, p. 225-61.
- GOODWIN, T.W. Methods of carotenes analysis. In: Paech, K. & Tracey, M.V. ed. *Modern Methods of Plant Analysis*. Berlin, Springer-Verlag, 1955, v.3, cap. 5, p. 272-311.
- GOODWIN, T.W. Nature and properties. In: *The Biochemistry of the Carotenoids*, 2nd ed., London, Chapman & Hall, 1980, p 1-32.
- GOODWIN, T.W. & BRITTON, G. Distribution and analysis of carotenoids. In Goodwin, T.W., ed. *Plant Pigments*. London, Academic Press, 1988, v. 1, cap. 2, p. 61-132.
- GORTNER, W.A. & SINGLETON, U.L. Carotenoid pigments of pineapple fruit II. Influence of fruit ripeness, handling and processing on pigment isomerization. *J. Food Sci.* 26: 53-5, 1961.
- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I.; ROJAS-HIDALGO, E. An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids including 15-/13- and 9-cis- β -carotene isomers, phytoene and phytofluene. *J. Liquid Chromat.* 14(13): 245-75, 1991.

- GREGORY, G.K.; CHEN, T.S.; PHILIP, T. Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: Red bell peppers. *J. Food Sci.* 52: 1071-3, 1987.
- GROSS, J. Carotenoid changes in the mesocarp of the Readhaven peach (*Prunus Persica*) during ripening. *Z. Pflanzenphysiol* 94: 461-5, 1979.
- GROSS, J.; GABAI, M.; LIFSHITZ, L. Carotenoids in juice of shamouti orange. *J. Food Sci.* 36: 466-73, 1971.
- GROSS, J.; GABAI, M.; LIFSHITZ, L. The carotenoids of the avocado pear. *J. Food Sci.* 37: 589-91, 1972.
- GROSS, J.; GABAI, M.; LIFSHITZ, L. Carotenoids of *Eriobotrya japonica*. *Phytochem.* 12: 1775-82, 1973.
- HEINONEM, M.I. Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38: 609-12, 1990.
- HEINONEM, M.I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLE, E.K.; VARO, P.T.; KOIVISTOINEN, P.E. Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37: 655-59, 1989.
- HERINGE, E.P. O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb) Brasil *Florestal* 2(1): 28-31, 1962.

HIANE, P.A. & PENTEADO, M.V.C. Carotenóides e valores de vitamina A do fruto e da farinha de bocaiúva (*Acrocomia mokayóyba* Barb. Rodr.) do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo* 25: 158-68, 1989.

HSIEH, Y.P.C. & KAREL, M. Rapid extraction and determination of alpha- and beta-carotenes in foods. *J. Chromatogr.* 259: 515-8, 1983.

IBGE-ENDEF, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Estudo Nacional de Despesa Familiar*. Publicações especiais: Tabelas de composição de alimentos, 3 ed., Rio de Janeiro, 1985, v.3, t.1, p. 51-5.

ISAKEN, M. & FRANCIS, G.W. Preparative HPLC of carotenoids. *Chromatographia* 27: 325-7, 1989.

ISLER, O.; LINDLAR, H.; MONTAVON, M.; RUEGG, R.; RYSER, G.; ZELLER, P. Sythesen in der carotinoid-reiche. Totalsynthese von β -carotene. *Helv. Chim. Acta* 49: 463-73, 1965.

ISLER, O.; LINDLAR, H.; MONTAVON, M.; RUEGG, R.; SAUCY, G.; ZELLER, P. Sythesen in der carotinoid-reiche. Totalsynthese von β -cryptoxanthin. *Helv. Chim. Acta* 40: 456-7, 1957.

IVACG. Minutes of the 12th Meeting of the International Vitamin A Consultative Group, 7-12 December, Addis Ababa. The Nutrition Foundation, Washington, DC, 1987.

- JAVOR, T.; BATA, M.; LOVASZ, L.; MORAN, F.; NAGY, L.; PATTY, I.; SZABOKS, J.; TARNOK, F.; TOTH, G.; MOSZIK, G. Gastric cytoprotective effects of vitamin A and other carotenoids. *Int. J. Tissue React.* 5: 289-93, 1983.
- JENSEN, S.L.; HEGGE, E.; JACKMAN, L.M. Bacterial Carotenoids XVIII. The carotenoids of phytosynthetic green bacteria. *Acta Chem. Scand.* 18(7): 1703-18, 1964.
- KARRER, P. & JUCKER, E. Oxyde des β -carotins: β -carotin-mono-epoxyd, β -carotin-di-epoxyd, mutachrom, aurochrom, luteochrom. *Helv. Chim. Acta*, Basel 28(1): 427-36, 1950.
- KATAYAMA, T.; NAKAYAMA, T.O.M.; LEE, T.H.; CHICHESTER, C.O. Carotenoids transformations in ripening apricots and peaches. *J. Food Sci.* 36: 804-6, 1971.
- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Decapreno-beta-carotene as an internal standard for the quantification of the hydrocarbon carotenoids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 346: 237-46, 1985
- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Application of C-45- β -carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 35: 732-8, 1987.
- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 36: 929-37, 1988.

KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; LUSBY, W.R. Separation, identification and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe and pink grapefruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1465-73, 1989.

KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; GOLI, M.B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* 63(1): 71-80, 1991.

KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; WHITAKER, N.F. Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 43: 603-16, 1986.

KHACHIK, F.; GOLI, M.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W.R.; TENORIO, M.D.; BARRERA, M.R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 390-8, 1992.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; GODOY, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. *Food Chem* 35: 187-95, 1990.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; YOKOYAMA, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24: 415-8, 1991.

- KLAUI, H. & BAUERNFEIND, J.C. Carotenoids as food colors. In Bauernfeind, J.C., ed., *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. New York, Academic Press, 1981, cap. 2, p. 47-317.
- KLEIN, B.P. & PERRY, A.K. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J. Food Sci.* 47: 941-5, 1982.
- KOBAYASHI, K.; ISO, H.; NISHIYAMA, K.; AKUTA, S. Studies on carotenoid pigments and colour of fruit in Japan. Composition of carotenoids in loquat fruits (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *J. Jap. Soc. Food Sci. and Technol.* 25(4): 191-5, 1978.
- KRINSKY, N.I. Carotenoids and cancer in animal models. *J. Nutr.* 119: 1233-36, 1989.
- LAMBERT, W.E.; NELIS, H.J.; DE RUYTER, M.G.M.; DE LEENHEER, A.P. Vitamin A: Retinol, carotenoids and related compounds. In: De Leenheer, A.P., Lambert, W.E. & De Ruyter, M.G.M., ed., *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1985, p. 1-72.
- LAWRENCE, D.R.; MC NAUGHTON, D.E.; AGNEW, M.P. Simple liquid chromatographic method for determination of carotenoids in alfalfa products. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 70: 428-33, 1987.
- LEE, C.Y. Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. *Food Chem.* 20: 285-93, 1986.

- LEE, C.Y.; McCOON, P.E.; LeBOWITZ, J.M. Vitamin A value of sweet corn. *J. Agric. Food Chem.* 29: 1294-5, 1981.
- LEE, C.Y.; SMITH, N.L.; ROBINSON, R.W. Carotenoids and vitamin A value of fresh and canned winter squashes. *Nutr. Reps. Int.* 29: 129-33, 1984.
- LEE, W.G.; AMMERMAN, G.R. Carotene stereoisomerization in sweet potatoes as affected by rotating and still retort canning processes. *J. Food Sci.* 39: 1188-91, 1984.
- LESELLIER, E.; MARTY, C.; BERSET, C.; TCHAPLA, A. Optimization of the isocratic non-aqueous reverse phase (NARP) HPLC separation of trans/cis- α - and β -carotene. *J. High Resol. Chromatogr.* 12: 447-54, 1989.
- LEUNG, W.T.W.; FLORES, M. The Institute of Nutrition of Central America e Panamá and The Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense - *Food Composition Table for use in Latin America (INCAP-ICNND)*, 1961.
- LEWIS, E.P. & MERROW, J.B. Influence on the established of β -carotene by other carotenoids in butternut squashes at harvest and during storage. *J. Agric. Food Chem.* 10: 53-6, 1962.
- LIAAEN-JENSEN, S. Isolation, reactions. In: Isler, O., ed., *Carotenoids*. Basel, Berkhauser Verlag, 1971, p.61-188.
- LIAAEN-JENSEN, S. Structural elucidation of carotenoids: A progress report. *Pure Appl. Chem.* 35: 81-112, 1973.

MACKINNEY, C. Carotenoids of the peach. *Plant physiol.* 42: 216-9, 1937.

MCCARTY, C.D.; LESLEY, J.W. The carotenoids, Amygdalin content, and Titratable acidity of white and yellow fleshed peaches with in a nearly isogenic line. *Am. Soc. Hortic. Sci.* 64: 289-94, 1954.

MATUS, Z.; BARANYAI, M.; TOTH, G.; SZABOLCS, J. Identification of oxo, epoxy and some cis-carotenoids in high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 28: 249-52, 1981.

MATHEWS-ROTH, M.M. Carotenoids and cancer prevention experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.* 57: 717-22, 1985.

MEJIA, L.A.; HUDSON, E.; GONZALES de MEJIA, E.; VASQUEZ, F. Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of mexican peppers (*Capsicum annuum*) as determined by HPLC. *J. Food Sci.* 53: 1448-51, 1988.

MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25: 213-9, 1990.

MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1094-7, 1991a.

MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. *Chromatographia* 28: 249-52, 1989.

MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Desempenho da camada delgada de alta eficiência multi-desenvolvimento para triagem de carotenóides. *Cienc. Technol. Alim.* 11(2): 200-9, 1991b.

MIRANDA, J.S. Contribuição ao estudo da cultura do pequi (*Caryocar* sp): propagação e concentração de nutrientes. Paraíba, 1986. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba.

MOSS, G.P. & WEEDON, B.C.L. Chemistry of carotenoids. In Goodwin, T.W., ed., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed., London, Academic Press, 1976, v. 1, cap. 3, p. 149-224.

MOSZIK, G.; BATA, M.; JAVOR, T.; MORON, F.; SZABOLCS, J.; TOTH, G. Cytoprotective effect of vitamin A and carotenoids on the injury of the gastric mucosa caused by 0,6M hydrochloric acid. *Taplakozastud Helyzette Feladatia Magyarorzagon* 8: 781-5, 1983.

MULRY, M.C.; SCHMIDT, R.H.; KIRK, J.R. Isomerization of retinyl palmitate using conventional lipid extraction solvents. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 66: 746-50, 1983.

NAS-NRC. National Academy of Science/National Research Council *Recommended Dietary Allowances*, 9th ed., Washington, 1980, p. 55-71.

- NELIS, H.J.C.F. & DE LEENHEER, A.P. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal. Chem.* 55: 270-5, 1983.
- NIERENBERG, D.W. Serum and plasma β -carotene levels measured with an improved method of high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 339: 273-84, 1985.
- NOGA, G. & LENZ, F. Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 17: 139-42, 1983.
- OGUNLESI, A.T. & LEE, C.Y. Effect of processing on the stereoisomerization of major carotenoids and vitamin A value of carrots. *Food Chem.* 4: 311-8, 1979.
- OJIMA, M.; KIGITANO, O. Cultura da nespereira. *Revista de Agricultura* 21(2): 1-7, 1978.
- O'NEIL, C.A.; SCHWARTZ, S.J.; CATIGNANI, G.L. Comparison of liquid chromatographic methods for determination of *cis-trans* isomers of beta-carotene. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 36-42, 1991.
- ONG, D.E. & CHYTIL, F. Vitamin A and cancer. In: Aurbach, G.D., ed., *Vitamins and Hormones*, vol 40, New York, Academic Press, 1983, p. 105-32.

PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. *Acta Alimentaria* 16: 209-16, 1987.

PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (*Psidium guajava* L.). *Food Chem.* 20(1): 11-9, 1986.

PADULA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; MORAES, M.A.C. Comparison of the carotenoid composition and general properties of the processed juice of guava IAC-4 and commercial juices. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 3(2): 109-16, 1983.

PANALAKS, T. & MURRAY, T.K. The effect of processing on the content of carotene isomers in vegetables and peaches. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 3(4): 145-51, 1970.

PARRISH, D. E. Determination of vitamin A in foods: A review, *CRC. Crit. Revs. Food Sci. Nutr.* 9: 375-94, 1977.

PECHNIK, E. & GUIMARÃES, L.R. Alguns representantes do reino vegetal portadores do elevado potencial pró-vitamínico A. *Arg. Bras. Nutr.* 13(1): 9-12, 1957.

PEIXOTO, A.R. Buriti e Murici. Em: *Plantas Oleaginosas Arbóreas*. São Paulo, Livraria Nobel, 1973, p. 155-67.

PENTEADO, M.V.C. & ALMEIDA, L.B. Ocorrência de carotenóides em raízes de cinco cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Estado de São Paulo. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo* 24(1): 39-49, 1988.

- PENTEADO, M.V.C.; MINAZZI, R.S.; ALMEIDA, L.B. Carotenóides e atividade pro-vitáminica A de folhas de hortaliças consumidas no norte do Brasil. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo* 22(2): 97-102, 1986.
- PEPPING, F.; VENCKEN, C.M.J.; WEST, C.E. Retinol and carotene content of foods consumed in East Africa determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 45: 359-71, 1988.
- PESEK, C.A.; WARTHESEN, J.J.; TAOUKIS, P.S. A kinetic model for equilibration of isomeric beta-carotenes. *J. Agric. Food Chem.* 38: 41-5, 1990.
- PETERSSON, R. & JONSSON, J.D. Development of a method for the estimation of provitamin A carotenoids in some fruits. *J. Food Sci.* 53: 1703-6, 1990.
- PHILIP, T. & CHEN, T.S. Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 435: 113-26, 1988a.
- PHILIP, T. & CHEN, T.S. Development of a method for the quantitative estimation of provitamin A carotenoids in some fruits. *J. Food Sci.* 53: 1703-6, 1988b.
- PHILIP, T. & CHEN, T.S. Quantitative analysis of major carotenoid fatty acid esters in fruits by liquid chromatography: persimmon and papaya. *J. Food Sci.* 53: 1720-2, 1988c.

- PHILIP, T.; CHEN, T.S.; NELSON, D.B. Liquid chromatographic profiles of major carotenoid esters in commercially processed California navel and Valencia orange juice concentrates. *J. Chromatogr.* 442: 249-65, 1988.
- QUACKENBUSH, F.W. Reverse phase HPLC separation of *cis* and *trans* carotenoids and its application to beta-carotenes in food materials. *J. Liq. Chromatogr.* 10: 643-53, 1987.
- QUACKENBUSCH, F.W. & SMALLIDGE, R.L. Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantitation of provitamins A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 767-72, 1986.
- QUACKENBUSCH, F.W.; DYER, M.A.; SMALLIDGE, R.L. Analysis for carotenes and xanthophylls in dried plant materials. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 53: 181-5, 1970.
- RAHMAN, F.M.M & BUCKLE, K.A. Pigment changes in capsicum cultivars during maturation and ripening. *J. Food Technol.* 15: 241-6, 1980.
- RAMOS, D.M.R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. *J. Micronutrient Anal.* 3: 147-55, 1987.
- RANGANATH, D.R. & DUBASH, P.J. Loss of colour and vitamins on dehydration of vegetables. *Indian Food Packer* 8: 4-10, 1981.

- REEDER, S.K. & PARK, G.L. A specific method for the determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58: 595-8, 1975.
- RITENBAUGH, C. Carotenoids and cancer. *Nutr. Today*, January/February, 14-9, 1987.
- RODRIGUEZ, D.B.; RAYMUNDO, L.C.; LEE, T.C.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 40: 615-22, 1976a.
- RODRIGUEZ, D.B.; TANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON, K.L.; LEE, T.C.; CHICHESTER, C.O. Hydroxylation of β -carotene on microcel C. *J. Agric. Food Chem.* 24: 819-22, 1976b.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical Review of Provitamina A Determination in Plants Foods. *J. Micronutrient Anal.* 5: 191-225, 1989.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.* 19(4): 227-35, 1985.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & AMAYA-FARFAN, J. Estado actual de los metodos analíticos para determinar provitamina A. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 1991 (no prelo).
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit, *Cyphomandra betacea*. *Food Chem.* 12: 61-5, 1983.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. Composição de carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 9(2): 148-62, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T.; ARIMA, H.K. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrophotometry. *J. Chromatogr. Sci.* 26: 624-9, 1988.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & TAVARES, C.A. Importance of *cis* isomer separation in determining provitamin A in tomato products. *Food Chem.* 45: 54-7, 1992.

ROUCHAUD, J.; MOONS, C.; MEYER, J.A. Effects of pesticide treatments on the carotenoid pigments of lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 32: 1241-5, 1984.

ROUSEFF, R.B.; SADLER, G.D.; PUTNAN, T.J.; DAVIS, J.E. Determination of β -carotene and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 40: 47-51, 1992.

RÜEDI, P. HPLC: A powerful tool in carotenoid research. *Pure Appl. Chem.* 57: 793-800, 1985.

RYMAL, K.S.; NAKAYAMA, T.O.M. Major carotenoids of the seeds of three cultivars of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Agric. Food Chem.* 22: 715-17, 1974.

- SADOWSKI, R. & WOJCIK, W. Chromatography of chloroplast carotenoids on magnesium oxide thin layers. *J. Chromatogr.* 262: 455-9, 1983.
- SALEH, M.H.; TAN, B. Separation and identification of cis/trans carotenoids isomers. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1438-43, 1991.
- SANTOS, M.C.; BOBBIO, P.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of rami (*Bohemeria nivea*) leaves. *Acta Alimentaria* 17: 33-5, 1988.
- SCHMIDT, K.; FRANCIS, G.W.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids XXXVI. Remarkable C₄₃-carotenoids artefacts of crossconjugated carotenals and new carotenoid glucosides from *Athiorhodaceae* spp. *Acta Chem. Scand.* 25: 2476-86, 1971.
- SCHMITZ, H.H.; ARTZ, W.E.; POOR, C.L.; DIETZ, J.M.; ERDMAN, J.W.Jr High-performance liquid chromatography and capillary supercritical-fluid chromatography separation of vegetable carotenoids and carotenoid isomers. *J. Chromat.* 479(2): 261-8, 1989.
- SCHWARTZ, J.J. & PATRONI-KILLAM, M. Detection of cis-trans carotene isomers by two-dimensional thin-layer and high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33: 1160-3, 1985.
- SCHWIETER, U.; BOLLIGER, H.R.; CHOPARD-dit-JEAN, L.H.; ENGLERT, G.; KOFLER, M.; KONIG, A.; von-PLANTA, C.; RUEGG, R.; VETTER, W.; ISLER, O. Zum stoffwechsel von β -apo-8'-carotinal (C₃₈) *Chimia* 19: 294-302, 1965.

SCOTT, A.I. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products. In: Barton, D.H.R. & Doering, W., ed. *Organic Chemistry*. Oxford, Pergamon Press, 1964, v. 7, p. 45-88 e 269-75.

SHERMA, J. Pigments on silica gel and aluminum hydroxide loaded papers. *J. Chromat.* 61: 202-4, 1971.

SIMON, P.W. & WOLFF, X.Y. Carotenes in typical and dark orange carrots. *J. Agric. Food Chem.* 35: 1017-22, 1987.

SIMPSON, K.L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 7-17, 1983.

SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 1: 351-63, 1981.

SIMPSON, K.L. & TSOU, S.C.S. Vitamin A and provitamin composition of foods. In: Bauerfeind, J.C., ed. *Vitamin A Deficiency and its Control*. New York, Academic Press, 1986, p. 461-78.

SIMPSON, K.L., TSOU, S.C.S.; CHICHESTER, C.O. Carotenes. In: Augustin, J., Klein, B.P., Becker, D.A. & Venugopal, P.B., ed. *Methods of Vitamin Assay*. 4th ed., New York, John Wiley, 1985, cap. 8, p. 185-220.

- SINGLETON, V.L.; GORTNER, W.A.; YOUNG, H.Y. Carotenoids Pigments of Pineapple fruit I. Acid-catalyzed Isomerization of the pigments. *J. Food Sci.* 26: 49-52, 1961.
- SPEEK, A.J.; TEMELILWA, C.R.; SHRIJVER, J. Determination of β -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem* 19: 65-74, 1986.
- SPEEK, A.J.; SPEEK-SAICHUA, S.; SCHREURS, W.H.P. Total carotenoid and beta-carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chem.* 27: 245-57, 1988.
- STANCHER, B. & ZONTA, F. High-performance liquid chromatographic determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in foods. *J. Chromat.* 238: 217-22, 1982.
- STEWART, I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 132-6, 1977a.
- STEWART, I. Provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1132-7, 1977b.
- STEWART, I. & WHEATON, T.A. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. *J. Agric. Food Chem.* 20: 448-9, 1972.

- STEWART, I. & WHEATON, T.A. Conversion of β -citraurin to reticulaxanthin and β -apo-8'-carotenal to citranaxanthin the isolation of carotenoids from citrus. *Phytochem.* 12: 2947-51, 1973.
- STRAIN, H.H.; SHERMA, J.; GRANDOLFO, M. Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents. *Anal. Chem.* 39: 926-32, 1967
- SUBBARAYAN, C. & CAMA, H.R. Carotenoids in *Carica papaya* (Papaya fruit). *Indian J. Chem.* 2: 451, 1964.
- SUMARTIS, J.D. & OFNER, A. Total synthesis of spirilloxanthin, dehydrolycopene, and 1,1'-dihydroxy-1,2,1',2',-tetrahydrolycopene. *J. Org. Chem.* 28: 2735-9, 1963.
- SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. Effect of processing on provitamin A in vegetables. *J. Am. Diet. Assoc.* 59: 238-43, 1971a.
- SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. Effects of selected herbicides on provitamin A content of vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 19: 854-61, 1971b.
- SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J. Nutr.* 103(1): 20-5, 1973.
- SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. Separation of carotene stereoisomers in vegetables. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53(5): 937-40, 1970.

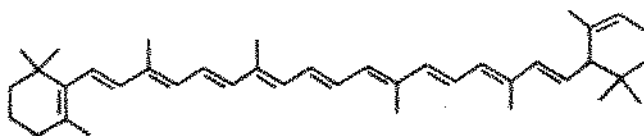
- TAKAGI, S. Determination of green leaf carotenoids by HPLC. *Agric. Biol. Chem.* 49(4): 1211-3, 1985.
- TAN, B.; GRADY, C.M.; GAWIENOWSKI, A.M. Hydrocarbon carotenoid profiles of palm oil processed fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 1175-9, 1986.
- TANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Stability of carotenoids on silica gel and other adsorbents. *Bull. Jap. Soc. Fish* 46: 799-803, 1981.
- TAVARES, C.A. *Composição de carotenóides e valor de vitamina A em tomate, milho, pêssego e seus produtos processados.* Campinas, 1991. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos). Fac. Eng. Alim., Universidade Estadual de Campinas.
- TAYLOR, R.F. Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv. Chromatogr.* 22: 157-213, 1983.
- TAYLOR, R.F. & DAVIES, B.H. Gas-liquid chromatography of carotenoids and other terpenoids. *J. Chromat.* 103: 327-40, 1975.
- TAYLOR, R.F.; HINCKLEY, C.E.; EKLUND, D.M.; MARENCHIC, T.G. Effects of saponification on carotenoids. *8th International Symposium on Carotenoids*, Boston, Massachusetts, 27-31 July. Abstracts presentations, 1987, p. 19.
- TEE, E.S. Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Critical Review. Food Sci. Nutr.* 31(1/2): 103-63, 1992.

- TEE, E.S. & LIM, C.L. The analysis of carotenoids and retinoids: A Review. *Food Chem.* 41: 147-93, 1991a.
- TEE, E.S. & LIM, C.L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. *Food Chem.* 41: 309-39, 1991b.
- THOMPSON, S.Y. Occurrence distribution and absorption of provitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 24: 136-46, 1965.
- THOMPSON, J.N. Problem of official methods and new techniques for analysis of foods and feeds for vitamin A. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 69: 727-38, 1986.
- THOMPSON, J.N. & MAXWELL, W.B. Reverse phase high pressure liquid chromatography of vitamin A in margarine, infant formule and fortified milk. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 60: 766-71, 1977.
- TRUJILLO-QUIJANO, J.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; ESTEVES, W.; PLONIS, G.F. Carotenoid composition and vitamin A value of oils from four Brazilian palm fruits. *Fat. Sci. Technol.* 92: 222-6, 1990.
- TSOU, S.C.S.; GERSHON, J.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Promoting household gardens for nutrition improvement. In: Tanphaichitri, V.; Dahlan, W. and Valyasevi, A. eds. *Human Nutrition, Better Nutrition, Better Life*. 4th Asian Congr. Nutr., Aksornsmai Press, Bangkok, Tailândia, 1984.

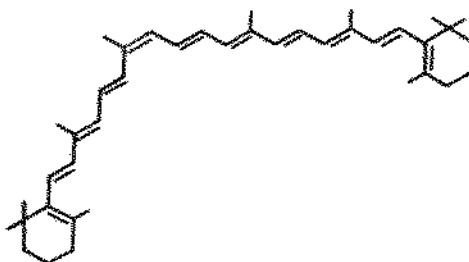
- TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; SIGIURA, M. Structural elucidation of the main *cis*- β -carotenes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 27: 551-61, 1981.
- TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T.; KOYAMA, Y. Separation and identification of *cis/trans*- β -carotenes by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 245: 359-64, 1982.
- UNDERWOOD, B.A. Vitamin A in animal and human nutrition. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., ed. *The Retinoids*. Orlando, Academic Press, 1984, v. 1, p. 281-392.
- VECCHI, M.; ENGLERT, G.; MAURER, R.; MEDUNA, V. Trennung und charakterisierung von beta-carotin-isomeren. *Helv. Chim. Acta* 64: 2746-58, 1981.
- VETTER, W.; ENGLERT, G.; RIGASSI, N.; SCHWIETER, U. Spectroscopic methods. In: Isler, O., ed. *Carotenoids*. Basle, Birkhauser Verlag, 1971, p. 189-266.
- WEEDON, B.C.L. Stereochemistry. In: Isler, O., ed. *Carotenoids*. Basle, Birkhauser Verlag, 1971, p. 267-323.
- WITSCHI, J.C.; HOUSER, H.B.; LITTEL, A. S. Preformed vitamin A, carotene and total vitamin A activity in usual adults diets. *J. Am. Diet. Assoc.* 57: 13-16, 1970.
- YOKOYAMA, H.; VANDERCOOK, C.E. Citrus Carotenoids I. Comparasion of carotenoids of mature-green an dyellow lemons. *J. Food Sci.* 32(1): 42-8, 1967.

- ZAKARIA, M.; SIMPSON, K.L.; BROWN, P.R.; KRSTULOVIC, A. Use of the reverse-phase, high performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J. Chromatogr.* 176: 109-17, 1979.
- ZECHMEISTER, L. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. *Chem. Rev.* 34: 267-344, 1944.
- ZECHMEISTER, L. Stereoisomeric provitamins A. *Vitam. Horm.* 7: 57-81, 1949.
- ZECHMEISTER, L. Natural pigments. In: Zechmeister, L., ed. *Progress in the Chemistry of organic Natural Products*. Vienna, Springer Verlag, 1960, v. 18, p. 223-227.
- ZECHMEISTER, L. *Cis-trans* isomeric carotenoids vitamins A and aryl polyenes. New York, Academic Press, 1962.
- ZECHMEISTER, L.; LeROSEN, A.L.; SCHROEDER, W.A.; POLGAR, A.; PAULING, L. Spectral characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including prolycopene and pro-gama-carotene. *J. Am. Chem. Soc.* 65: 1940-51, 1943.
- ZIEGLER, R. G. A review of epidemiologia evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119: 116-27, 1989.
- ZSCHEILE, F.P.; WHITE, J.W.; BEADLE, B.W.; ROACH, J.R. Prepn. and absorption spectra of pure carotenoid pigments. *Plant Physiol.* 17: 331-46, 1942.

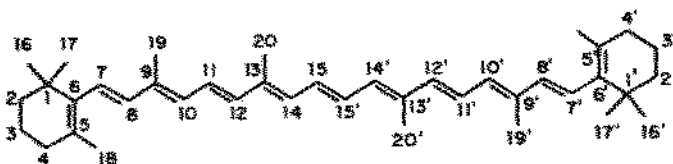
α -caroteno



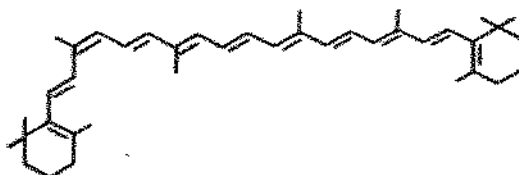
13-cis- β -caroteno



β -caroteno



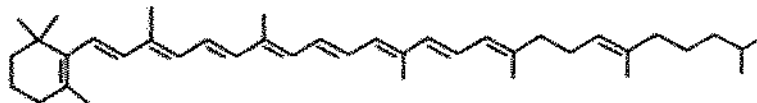
9-cis- β -caroteno



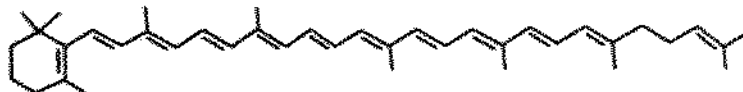
δ -caroteno



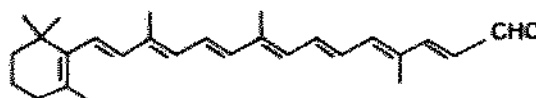
β -zeacaroteno



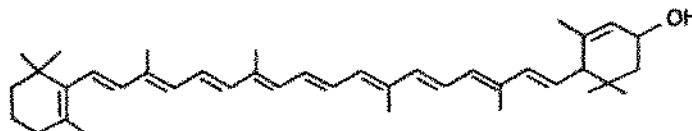
γ -caroteno



β -apo-10'-carotenol

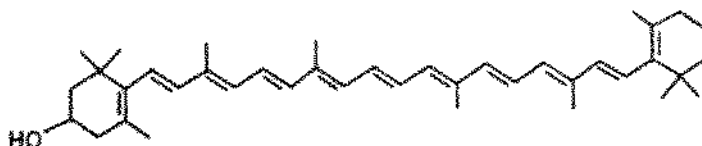


α -criptoxantina

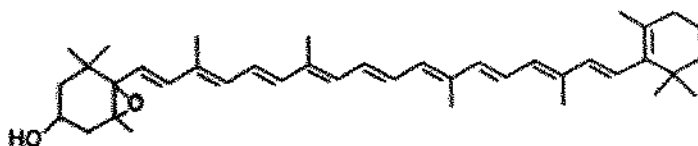


ANEXO 1: Estrutura dos carotenóides presentes nas amostras analisadas.

β -criptoxantina



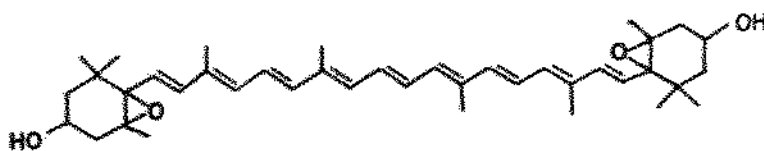
5,6-epoxi- β -criptoxantina



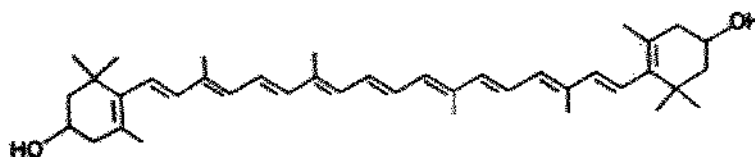
neurosporeno



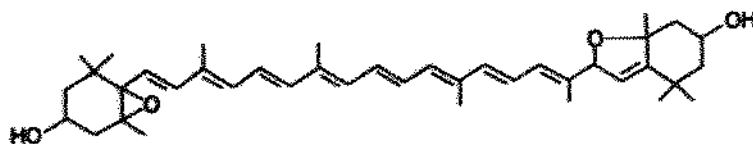
violaxantina



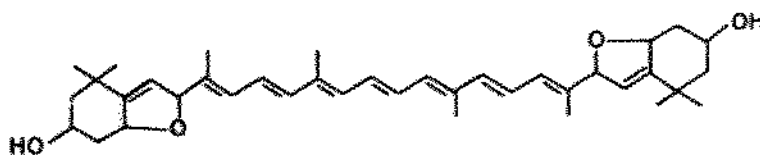
zeaxantina



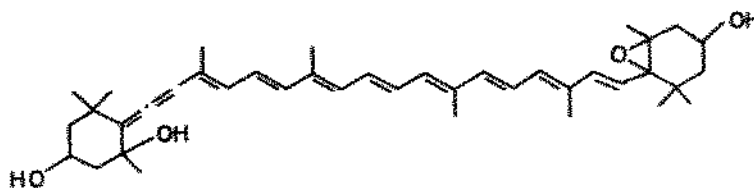
luteoxantina

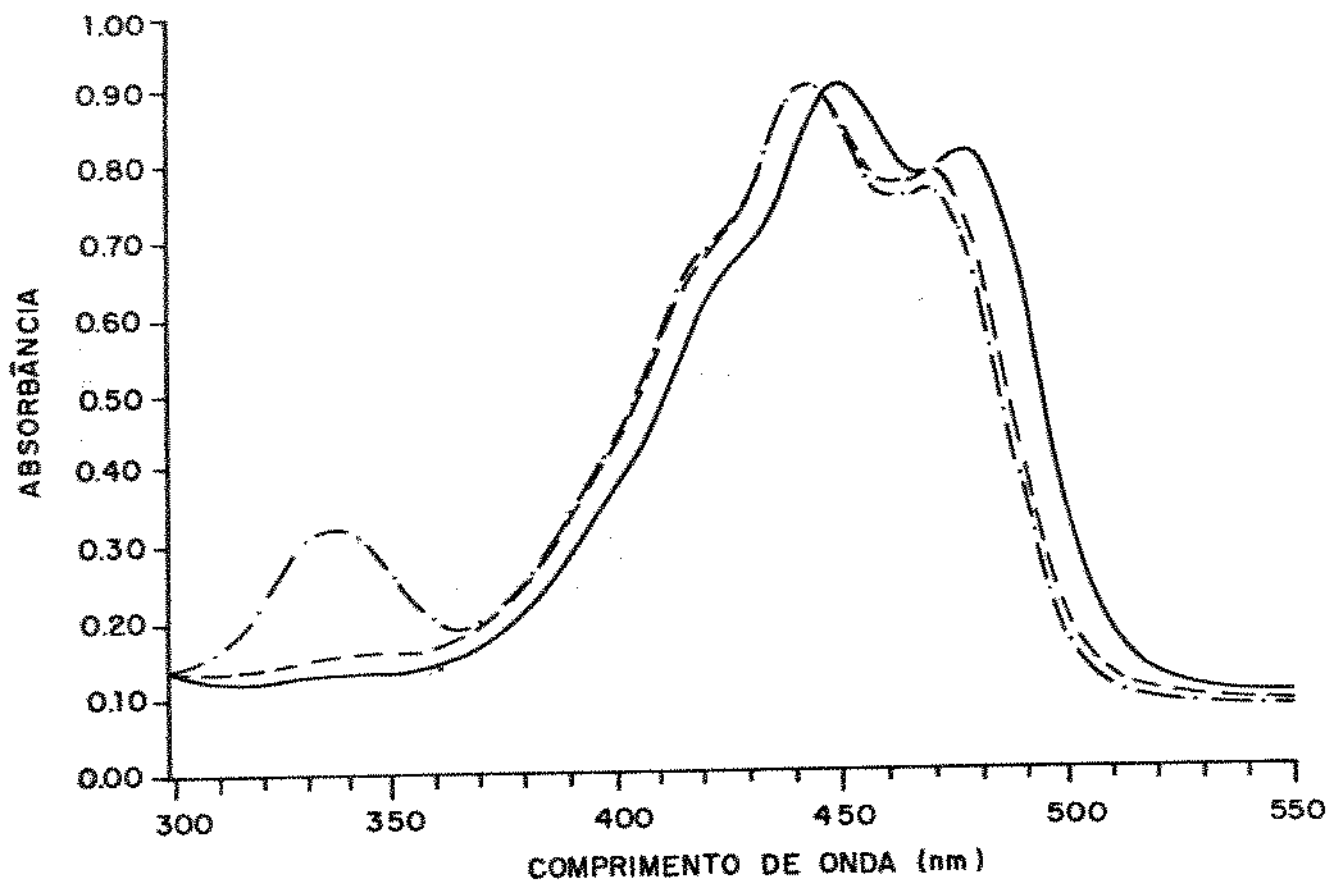


auroxantina

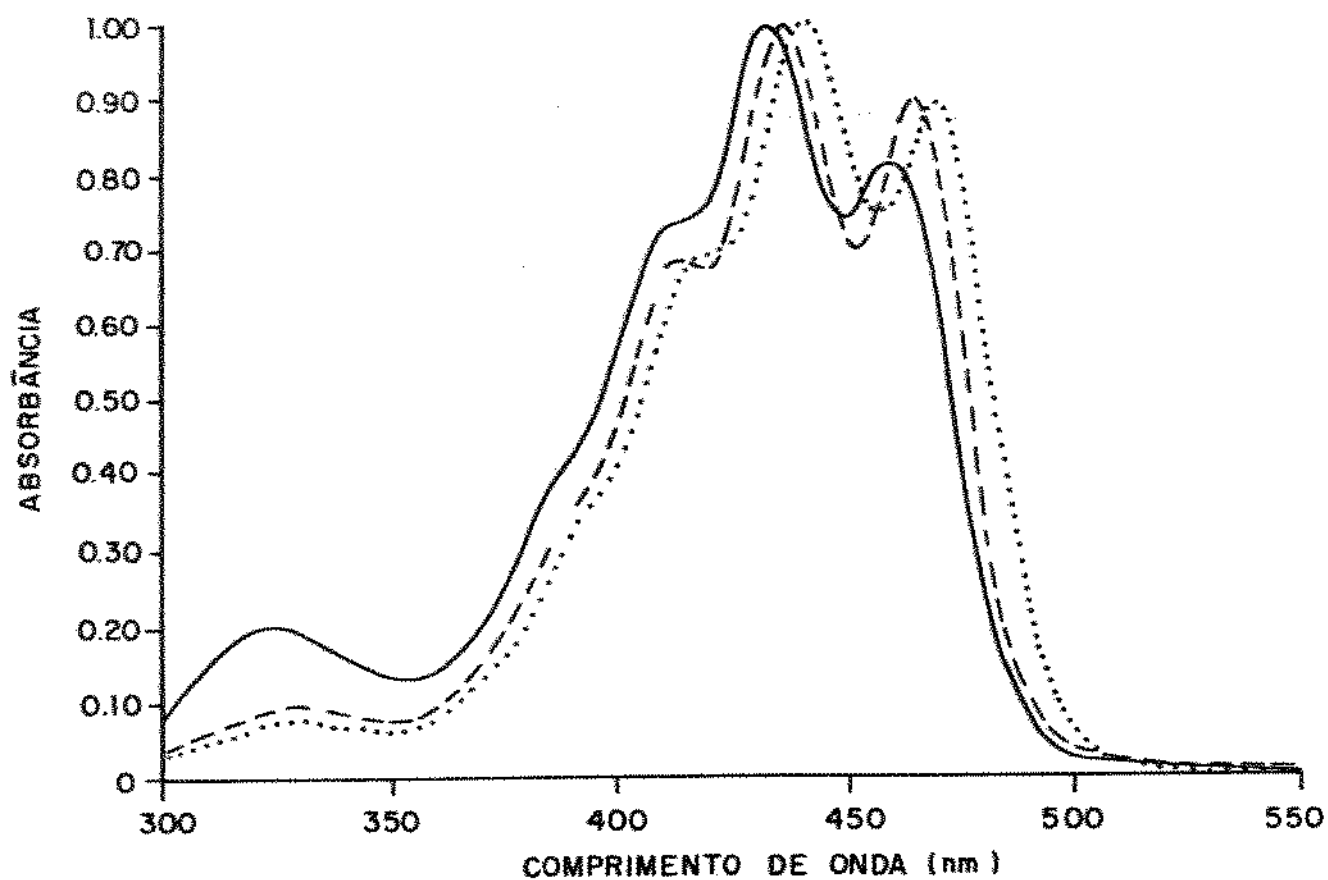


neoxantina

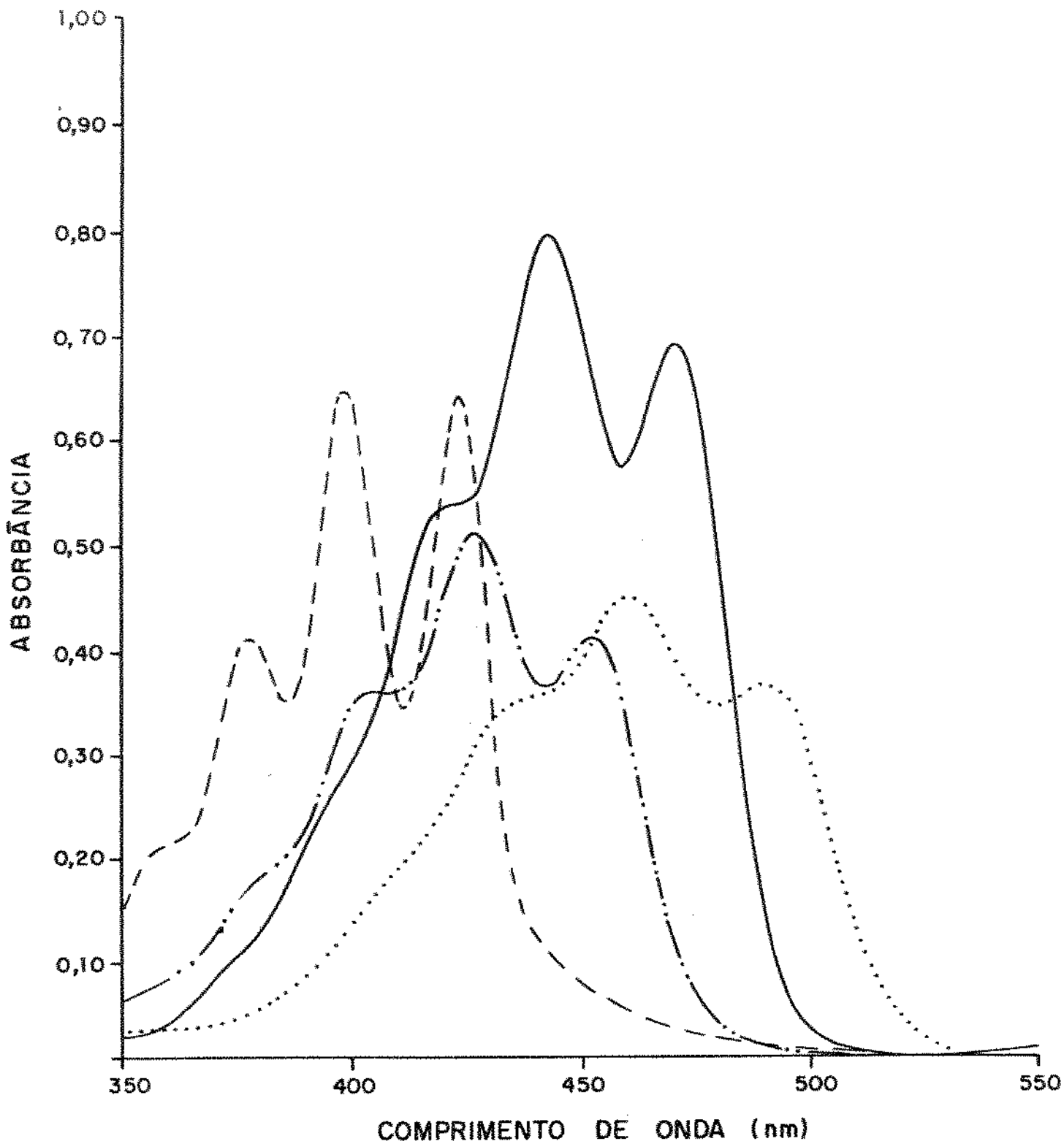




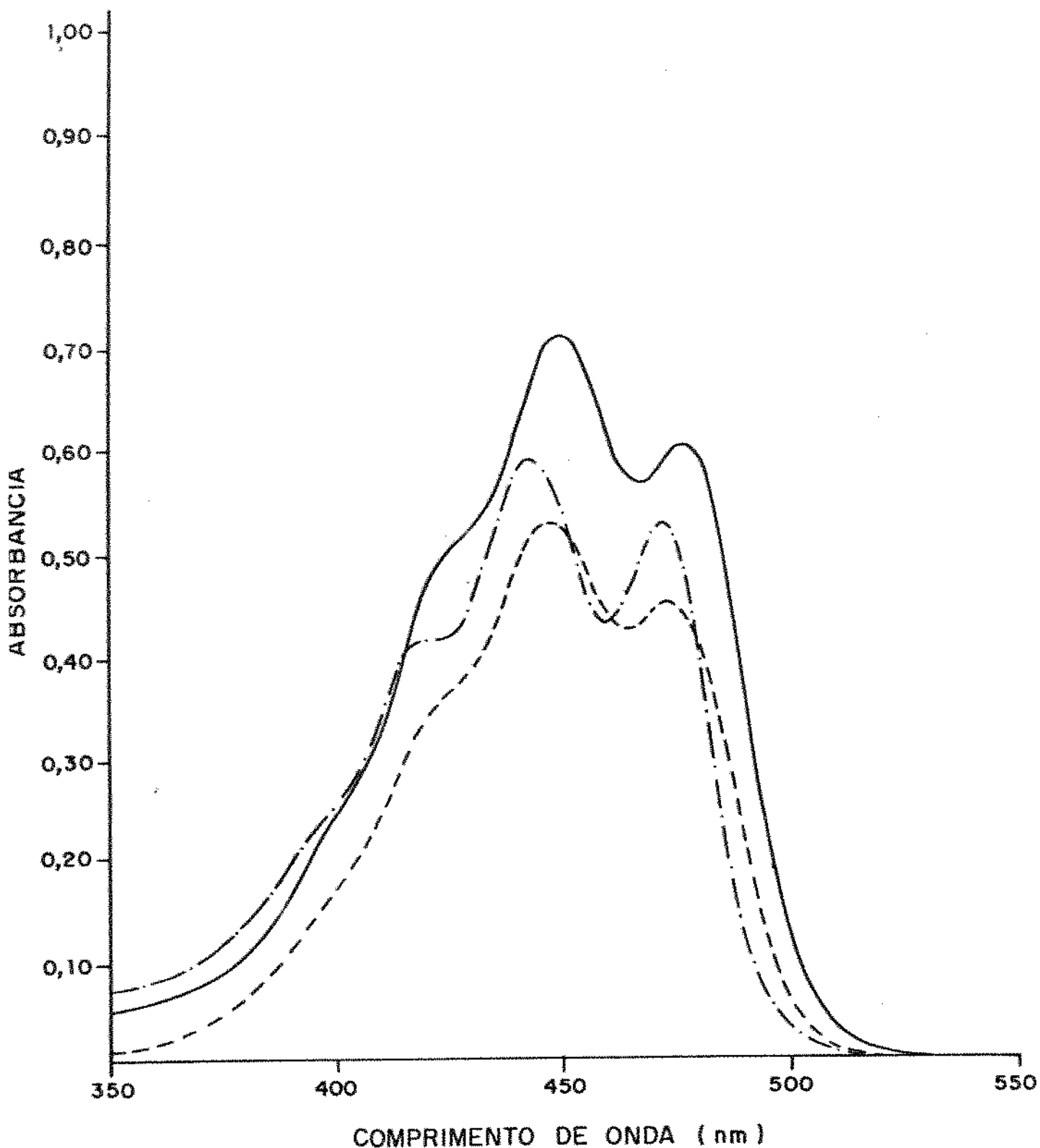
ANEXO 2: Espectro de absorção em éter de petróleo do β -caroteno e zeaxantina (—), 13-cis- β -caroteno (- · - ·) e 9-cis- β -caroteno (- - -).



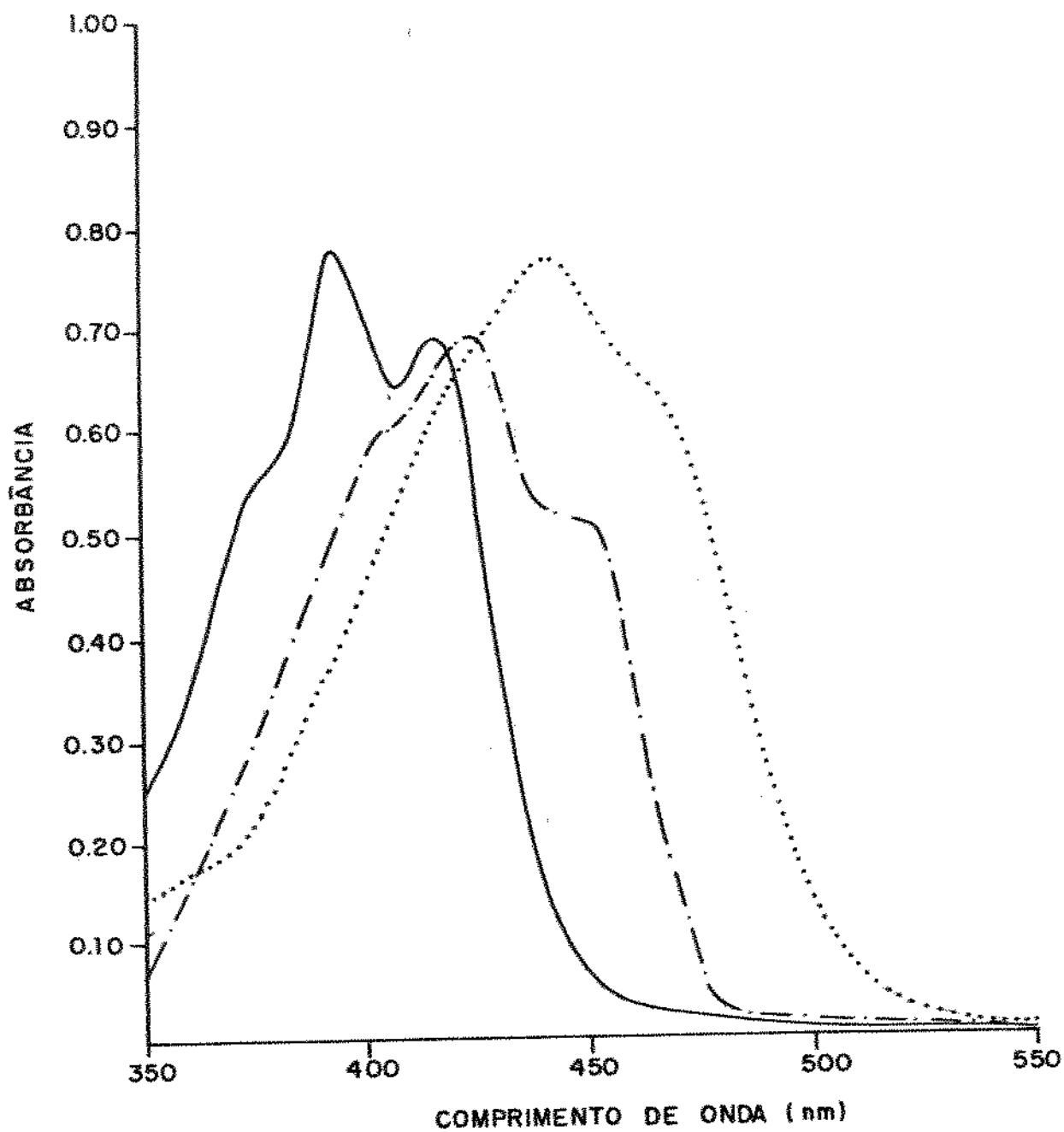
ANEXO 3: Espectro de absorção em éter de petróleo do α -caroteno (.....), 13-cis- α -caroteno (---) e 9-cis- α -caroteno (—)



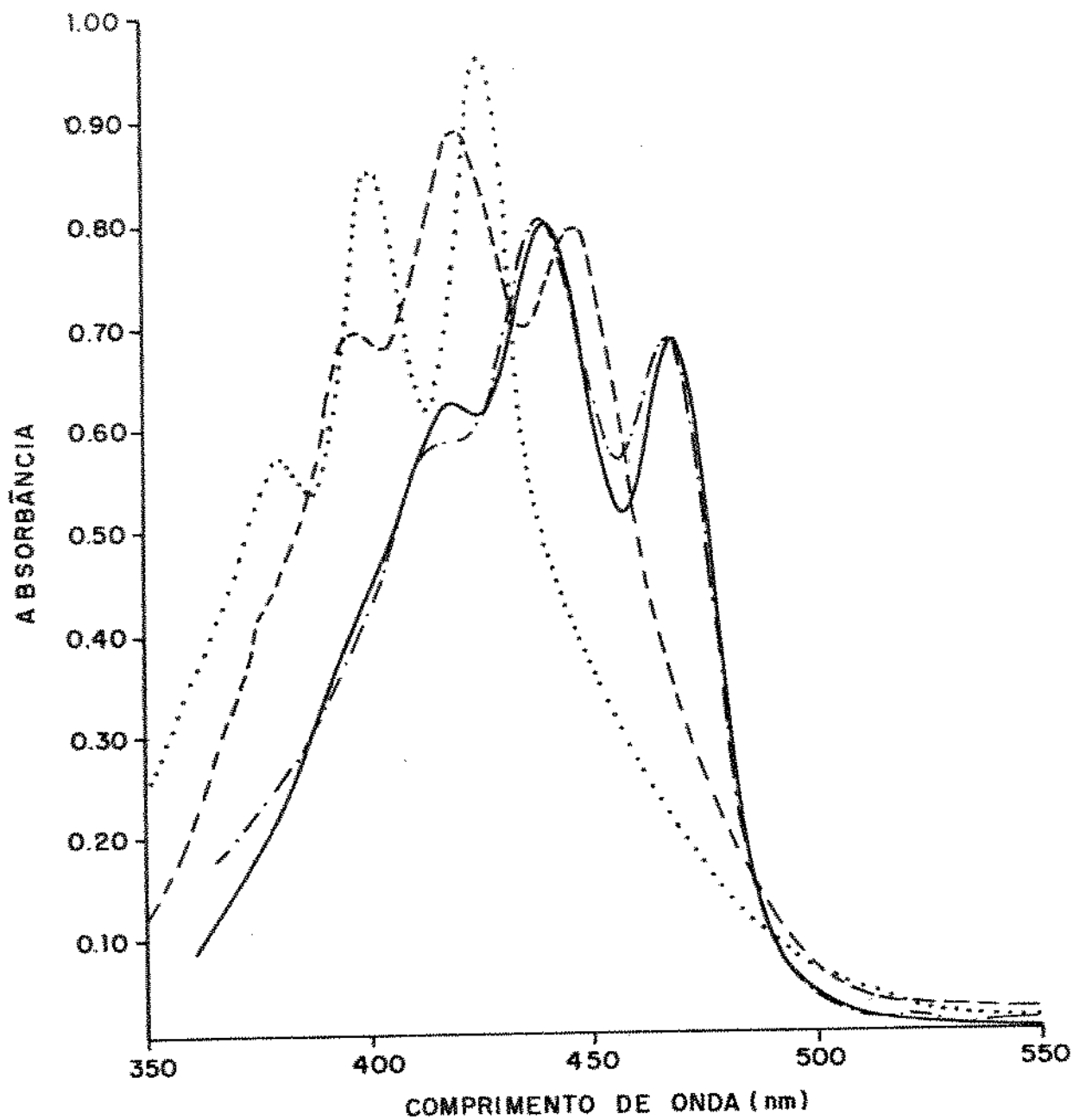
ANEXO 4: Espectro de absorção em éter de petróleo da α -criptoxantina (—), γ -caroteno (— — —), z -caroteno (- - -) e β -zeacaroteno (.....).



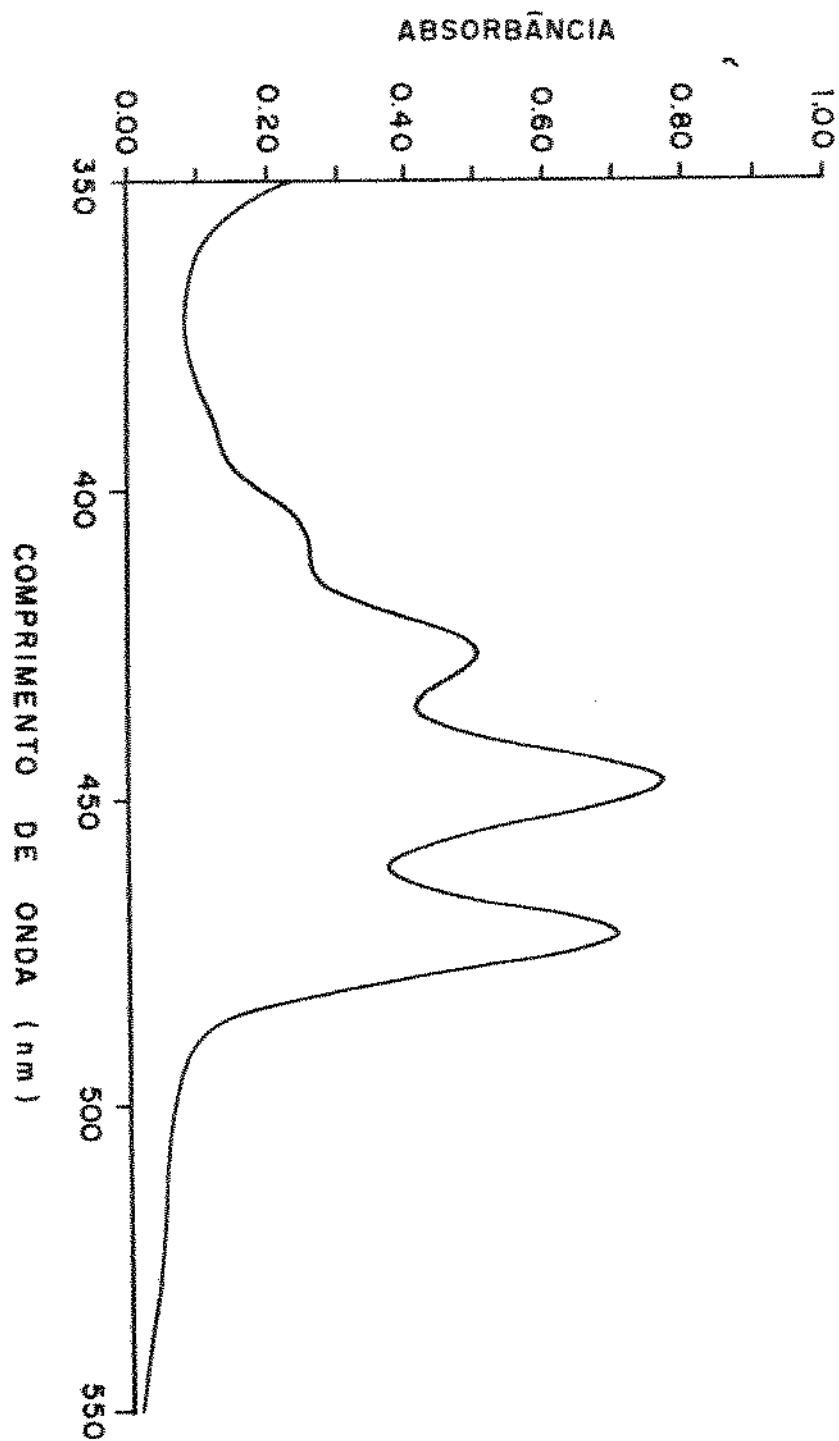
ANEXO 5: Espectro de absorção em éter de petróleo da β -criptonantina (—), neo- β -criptoxantina (---) e 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (-·-·).



ANEXO 6: Espectro de absorção em éter de petróleo do β -apo-8'-carotenol (—) e do β -apo-10'-carotenal, antes (.....) e depois (----) da reação de redução com NaBH_4 .



ANEXO 7: Espectro de absorção em éter de petróleo da vilolaxantina (—), luteoxantina (---), auroxantina (.....) e neoxantina (-.-.-).



ANEXO 8: Espectro de absorção em éter de petróleo do neurospore no .