

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos, UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciência de Alimentos

AVALIAÇÃO DAS PERDAS DE CAROTENÓIDES E VALOR DE
VITAMINA A DURANTE A DESIDRATAÇÃO E A LIOFILI-
ZAÇÃO INDUSTRIAL DE CENOURA E ESPINAFRE

RAMOS

Denise Maria Rosito Ramos

Engenheiro de Alimentos

Dra. Délia Rodriguez-Amaya

Orientadora

20/91

Campinas - 1991

Ramos

*Este exemplar corresponde a versão final da
Tese defendida por Denise Maria Rosito Ramos e apro-
vada pela Comissão Julgadora em 17.07.91.
Campinas, 17 de julho de 1991.*

Délia R. A.

PC-9107457

BANCA EXAMINADORA

Délia R. Amaya

Profa. Dra. Délia Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Eidiomar Angelucci

(Membro)

Heloísa M. Cecchi

Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi
(Membro)

Olavo Rusig

Prof. Dr. Olavo Rusig

(Membro)

Campinas, 17 de julho de 1991

Em memória de minha irmã, Balucka

Aos meus pais, Renato e Mariazinha

À Claudia e a Bruna

À vó Chiquinha

AGRADECIMENTOS

À Profa. Délia Rodríguez-Amaya minha admiração, respeito e meus agradecimentos pela orientação e formação de um espírito científico crítico, durante todos esses anos, desde a época de iniciação científica.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da parte prática deste trabalho.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de pós-graduação.

À UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas, pelas bolsas de Monitoria II e Incentivo Acadêmico.

À ABIA-Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, pelas cópias do trabalho.

À Liotécnica Essencial e as engenheiras Giuomar S. Vieira e Eliete M Batista, pelo fornecimento das amostras.

À Prof. Heloísa M. Cecchi, ao Prof. Olavo Rusig e ao Dr. Eidiomar Angelucci, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese.

Ao Prof. Paulo Bobbio por permitir o uso do espectrofotometro no laboratório de Química de Alimentos.

À Profa. Débora Q. Tavares e à Yara, do Laboratório de Microestrutura de Alimentos, pelo empréstimo e auxílio no uso da estufa a vácuo

À Prof. M. Cecília F. Toledo, do Laboratório de Toxicologia, pelo uso da centrífuga.

À Prof. Helena T. Godoy, pelo auxílio inestimável, durante as várias etapas desse trabalho.

Ao Marquinho, pela amizade e paciência, durante as várias horas na salinha de microcomputador

À Marta, querida amiga, pelo auxílio na parte estatística.

Ao Sr. Reynaldo, pela correção do português do texto.

Ao Márcio, Waldeci, Edson, Creusa, Cícera, Jardete, Telma, Cristiane, aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, e a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a conclusão desse trabalho

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	vi

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância dos Carotenóides em Alimentos.....	4
2.2. Biossíntese de Carotenóides.....	5
2.3. Carotenóides de Cenoura.....	
2.3.1. Composição completa.....	8
2.3.2. Valor de vitamina A.....	10
2.4. Carotenóides de Espinafre.....	
2.4.1. Composição completa.....	19
2.4.2. Valor de vitamina A.....	21
2.5. Degradação de Carotenóides e Perda do Valor de Vitamina A Durante a Desidratação e a Liofilização	
2.5.1. Fatores que influenciam a degradação.....	24
2.5.2. Tipos de degradação.....	24
2.5.3. Alterações durante o processo de desidrata- ção.....	26
2.5.4. Desidratação de cenoura.....	30
2.5.5. Desidratação de espinafre.....	32

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Matéria-prima.....	34
3.2. Processamento Industrial.....	35
3.3. Análises Químicas.....	38
3.3.1. Sólidos totais.....	38
3.3.2. Sólidos insolúveis.....	38
3.3.3. Sólidos solúveis.....	37
3.3.4. Determinação de carotenóides.....	39
3.3.4.1. Extração.....	39
3.3.4.2. Concentração.....	40
3.3.4.3. Separação.....	40
3.3.4.4. Identificação.....	41
3.3.4.5. Quantificação.....	44
3.3.4.6. Cálculo do valor de vitamina A..	44
3.3.4.7. Análise estatística.....	45

4. RESULTADOS

4.1. Composição qualitativa de Carotenóides de Ce- noura, Variedade "Nantes".....	46
4.2. Composição qualitativa de Carotenóides do Es- pinafre, Variedade "Nova Zelândia".....	53
4.3. Perdas durante desidratação e liofilização da cenoura.....	59
4.3.1. Repetibilidade do método.....	60
4.3.2. Variação dos sólidos totais, sólidos solú- veis e sólidos insolúveis o durante proces- samento.....	62
4.3.3. Perdas de carotenóides durante a desidrata- ção e a liofilização (base seca).....	64
4.3.4. Perdas de carotenóides durante o processa- mento (base de sólidos insolúveis).....	64
4.3.4.1. Perdas no branqueamento.....	64
4.3.4.2. Perdas de carotenóides na desi- dratação e na liofilização.....	64
4.3.4.3. Perdas de provitamina A.....	70

4.3.4.4. Variação da composição isomérica de β -caroteno.....	70
4.4. Perdas Durante a Desidratação e a Liofilização do Espinafre.....	74
4.4.1. Perda de carotenóides e valor de vita- mina A durante a desidratação e a liofili- zação (base seca).....	75
4.4.2. Variação da composição isomérica do β - caroteno durante a desidratação e a liofi- lização do espinafre.....	78
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

1. Carotenóides encontrados em cenoura.....	11
2. Variação do valor de vitamina A em cenoura.....	12
3. Valores de provitamina A e coeficientes de absorção de estereoisômeros de α - e β -caroteno.....	15
4. Concentração de isômeros de α - e β -caroteno de cenouras enlatadas, com e sem correção das respectivas biopotências.....	18
5. Carotenóides encontrados em espinafre.....	20
6. Variação do valor de vitamina A no espinafre.....	22
7. Características dos carotenóides encontrados em cenoura, variedade "Nantes".....	47
8. Características dos carotenóides encontrados em espinafre, variedade "Nova Zelândia".....	54
9. Concentração dos principais carotenóides de cenoura, variedade "Nantes".....	61
10. Variação de sólidos totais, sólidos insolúveis e sólidos solúveis durante a desidratação e a liofilização da cenoura.....	63
11. Mudanças nos conteúdos de carotenóides durante o processamento da cenoura (base seca).....	65
12. Mudanças nos conteúdos dos principais carotenóides da cenoura durante o branqueamento (base sólidos insolúveis).....	66

13. Mudanças nos conteúdos de carotenóides durante o processamento da cenoura (base sólidos insolúveis).....	67
14. Mudanças no valor de vitamina A durante o processamento da cenoura (base sólidos insolúveis).....	71
15. Variação na composição dos isômeros de α -caroteno durante o processamento da cenoura (base de sólidos insolúveis)...	72
16. Variação na composição dos isômeros de β -caroteno durante o processamento da cenoura (base de sólidos insolúveis)...	73
17. Variação de sólidos insolúveis, sólidos solúveis e sólidos totais durante a desidratação e a liofilização do espinafre.....	76
18. Perda de carotenóides e valor de vitamina A durante o processamento do espinafre (base seca).....	77
19. Variação da composição de isômeros de β -caroteno durante o processamento do espinafre (base seca).....	79
20. Comparação das mudanças do valor de vitamina A de espinafre (base seca) calculada sem e com separação dos isômeros.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Biossíntese de carotenóides.....	7
2. Principais rotas de degradação do β -caroteno.....	27
3. Fluxograma de desidratação e liofilização da cenoura.....	36
4. Fluxograma de desidratação e liofilização do espinafre.....	37
5. Esquema de separação dos carotenóides da cenoura.....	42
6. Esquema de separação dos carotenóides do espinafre.....	43
7. Estruturas dos carotenóides encontrados na cenoura, variedade "Nantes".....	48
8. Espectro de absorção, em éter de petróleo, de trans- α -caroteno, α -criptoxantina, luteína e 13-cis- α -caroteno.....	50
9. Espectro de absorção, em éter de petróleo, de trans- β -caroteno, zeaxantina, 9-cis- β -caroteno e 13-cis- β -caroteno.....	54
10. Espectro de absorção, em éter de petróleo, de γ -, δ - e ϵ -carotenos.....	52
11. Estruturas dos carotenóides encontrados no espinafre, variedade "Nova Zelândia".....	55
12. Espectros de absorção, em, etanol, de violaxantina, antes e após a adição de HCl.....	57
13. Espectros de absorção, em etanol, de neoxantina, antes e após a adição de HCl.....	58

RESUMO

Considerando as várias funções atribuídas aos carotenóides, o conhecimento de sua ocorrência em alimentos é de extrema importância. Suceptíveis à degradação, com conseqüente perda de cor e atividade fisiológicas, a sua possível destruição durante o processamento deve ser avaliada. No presente trabalho, foram investigadas mudanças na composição dos carotenóides da cenoura e do espinafre durante a desidratação por ar quente e por liofilização em escala industrial.

Na cenoura variedade "Nantes" foi confirmada a presença de α -, β -, ξ -, γ - e δ -carotenos, α -criptoxantina e luteína. O principal carotenóide foi o β -caroteno (55% do total) que, juntamente com o α -caroteno (27%), foi responsável pelo valor de vitamina A. A avaliação das perdas durante o processamento de cenoura foi dificultado devido a problemas com amostragem, mudanças nas condições de processamento e a escolha para a base de cálculo. Cálculos feitos na base seca resultaram em aumentos falsos apreciáveis. Mesmo na base de sólidos insolúveis, houve pequena ou nenhuma redução significativa nos carotenóides individuais, no conteúdo total e no valor de vitamina A. Em relação à desidratação, o β -caroteno diminuiu significativamente (13%), somente no primeiro dos três ensaios realizados. O α -caroteno não sofreu perda significativa em nenhum dos ensaios. O ξ -caroteno diminuiu significativamente no primeiro e aumentou no segundo e terceiro ensaios. O valor de vitamina A, no segundo e terceiro

ensaios, não se alterou significativamente. A diminuição observada no primeiro ensaio (13%) correspondeu à perda de β -caroteno (13%). Na liofilização, houve aumento inesperado de β -caroteno no primeiro e no segundo ensaio (28 e 17%), respectivamente). Uma vez que a reprodutibilidade do método foi demonstrada, a amostragem pode ter sido a possível causa. No terceiro ensaio, onde maior quantidade foi tomada e mais pontos foram amostrados, o α -caroteno teve uma diminuição significativa (21%), enquanto β e ξ -caroteno não se alteraram significativamente. A liofilização reduziu um pouco mais o valor de vitamina A (13%) em relação à desidratação no terceiro ensaio.

O espinafre, variedade "Nova Zelândia", apresentou cinco carotenóides: β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina e neoxantina. O único carotenóide provitamínico foi o β -caroteno, que corresponde a 28% do total de carotenóides. As perdas por desidratação e liofilização (base seca) de β -caroteno não foram consideráveis (12% para ambos). Violaxantina, luteína e zeaxantina se mantiveram constantes, também nos dois processamentos. A neoxantina teve um aumento (67%) inexplicável na desidratação, não sendo detectada na liofilização. A separação dos isômeros cis-trans de β -caroteno foi reproduzível. O valor de vitamina A, sem a separação dos isômeros, foi superestimado em 14 e 16% para as amostras fresca e desidratada, respectivamente. A perda do valor de vitamina A, por desidratação, calculada sem a separação dos isômeros foi de 16% e, com a separação, 11%. Na liofilização, a perda calculada com ou sem a separação dos isômeros, não teve diferença significativa.

SUMMARY

Considering the various functions attributed to carotenoids, a knowledge of their occurrence in foods is extremely important. Susceptible to degradation, with consequent loss of color and physiological activities, their possible destruction during processing should also be evaluated. In the present study, changes in the carotenoid composition on hot air dehydration and lyophilization were investigated.

In the carrot cultivar "Nantes", the presence of α -, β -, ξ - e δ -carotenes, α -criptoxantin and lutein was confirmed. The principal arotenoid was β -carotene (55% of the total), which together with α -carotene (27%) accounted for the vitamin A value. Evaluation of losses during processing of carrot was not easy because of difficulties in sampling, changes in processing conditions and the definition of the basis of calculation. Data calculated on the dry weight basis resulted in appreciable false increases. Even in the insoluble solid basis, no losses or only small significant reductions were observed in the individual carotenoids, total content and vitamin A value. In relation to dehydration, β -carotene decreased significantly (13%) only in the first of three trials. α -carotene suffered no significant losses in any of the trials conducted. ξ -carotene decreased significantly in the first but increase in the second and third trials. The vitmin A value in the second and third trials was not altered significantly. The reduction observed in the first trial (13%)

corresponded to the β -carotene loss. In lyophilization an unexpected increase in β -carotene in the first and second trials was observed. Since the analytical method was shown to be reproducible, sampling may be the possible cause. In the third trial, where a greater quantity was taken and more points were sampled, α -carotene diminished significantly (21%) while β -carotene and ξ -carotene remained constant. Liofilization lowered the vitamin A value slightly (13%) in relation to dehydration in the third trial

The spinach cultivar "Nova Zelândia" presented five carotenoids: β -carotene, violaxantin, lutein, zeaxantin and neoxantin. The only provitaminic A carotenoid was β -carotene which corresponded to 28% of the total carotenoid content. Losses in dehydration and lyophilization were not considerable (12% for both). Violaxantin, lutein and zeaxantin contents did not changed significantly in both processing. Neoxantin had an unexpected increase (67%) in dehydration which did not happen in lyophilization. Separation of cis-trans isomers of β -carotene was reproducible. The vitamin A value was superestimated by 14 and 16% in fresh and dehydrated samples, respectively, when the isomers were not separated. Loss in vitamin A value due to dehydration, calculated without isomer separation was 16% and with separation 11%. With lyophilization, the loss calculated with and without separation, did not differ significantly.

1 - INTRODUÇÃO

Especialmente nos países em desenvolvimento, uma grande parte da vitamina A da dieta é fornecida na forma de provitamina A (carotenóides), proveniente de frutas, legumes e hortaliças folhosos. As próvitaminas A contribuem mundialmente com 68% da vitamina A da dieta, enquanto que, nos países em desenvolvimento, essa contribuição chega a 82% (Simpson, 1983).

No Brasil, a deficiência de vitamina A vem sendo considerada um problema nutricional, em nível clínico nas regiões mais pobres e, sub-clínico nas regiões com maiores recursos. Com isso, tornou-se necessário conhecer os valores corretos de vitamina A em alimentos ("in natura" ou processados) largamente consumidos pela população.

A nível internacional, os carotenóides vêm despertando interesse contínuo e intenso devido às investigações que lhes atribuem outras funções fisiológicas, tais como prevenção de determinados tipos de câncer, ação inibidora nas mucosas contra úlceras gástricas, capacidade de prevenir a fotossensibilização em certas doenças de pele fotossensível e aumento da resposta imunológica a determinados tipos de infecção. Nos Estados Unidos, o grande investimento destinado a pesquisas com carotenóides tem sido devido a essas funções e não da atividade de vitamina A.

Por outro lado, devido ao alto grau de insaturação, os carotenóides são susceptíveis à isomerização e oxidação, levando à

perda de cor e da atividade biológica . As condições para essas reações degradativas existem nos diversos processamentos e durante a estocagem. Portanto, a retenção de carotenóides é um assunto que merece atenção especial.

A secagem é um dos mais antigos processos de conservação de alimentos. É um processo copiado da natureza e aperfeiçoado pelo homem. As vantagens da secagem são várias, entre elas, melhor conservação e redução de peso e volume do produto (facilitando o seu transporte e estocagem), além de uma razoável retenção das características físicas e nutricionais (Gava, 1978). É apontada, no entanto, como o processamento que provoca a maior destruição dos carotenóides pelo aumento considerável da área superficial, retirada de água e destruição da ultraestrutura.

No Brasil, não existem grandes problemas com a entressafra da maioria dos legumes e das hortaliças folhosas de maior consumo. A desidratação é realizada mais com o intuito de facilitar a preparação dos alimentos em determinadas condições, do que propriamente da conservação em si. Um exemplo é a utilização desse tipo de produto em alimentos institucionais, como a merenda escolar. Este fato é mais uma justificativa para a determinação do valor de vitamina A, uma vez que as crianças constituem a faixa da população mais afetada pela deficiência dessa vitamina.

Os produtos desidratados são também bastante utilizados comercialmente no preparo de sopas, risotos, molhos e temperos, desidratados ou não. No caso particular do espinafre, este é usado como reforçador de cor, por exemplo, em sopa de ervilha.

O presente trabalho teve por objetivos: (1) a confirmação da composição dos carotenóides da cenoura e do espinafre; (2) avaliação da retenção de carotenóides e valor de vitamina A nos processos de desidratação por ar quente e por liofilização.

Espinafre e cenoura foram escolhidos para este estudo, pois, além de exemplificarem boas fontes de provitamina A, são matrizes com características e composições de carotenóides diferentes.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância dos Carotenóides em Alimentos

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em fungos, bactérias, animais, plantas, frutas, flores, sementes e raízes (Simpson e Chichester, 1981). Nas plantas, estão complexados com proteínas do cloroplasto em folhas e outros tecidos verdes e, do cromoplasto, em frutas e vegetais maduros. Além disso, os carotenóides das frutas maduras estão esterificados com ácidos graxos (Goodwin, 1976).

Em alimentos, sua atuação como corante natural e a importância de alguns carotenóides como precursores de vitamina A na nutrição humana são bastante conhecidas.

Nos países em desenvolvimento, uma grande parte da vitamina A da dieta se encontra na forma de provitamina A, proveniente de alimentos de origem vegetal como algumas frutas, verduras e legumes. Os valores de vitamina A de algumas dessas fontes já se encontram disponíveis na literatura (INCAP - ICCNND, 1961; Franco, 1982) mas, na maioria dos casos, os dados não são confiáveis, uma vez que os métodos analíticos usados não diferenciavam carotenóides com e sem atividade provitamínica ou com atividades diferentes (Rodriguez-Amaya, 1989). Além disso, poucos trabalhos têm enfatizado a importância biológica dos cis-isômeros, embora seja conhecido que a transformação para a forma cis reduz a bio-

potência do β -caroteno e de outros carotenóides ativos (Zechmeister, 1949; Deuel, 1957).

Independente dessa atividade provitamínica, mais recentemente, o interesse em carotenóides tem aumentado consideravelmente. A ingestão de alimentos ricos em alguns carotenóides tem sido inversamente relacionada com o risco a determinados tipos de câncer (Mathews-Roth, 1982 e 1985; Peto et al., 1981; Shekelle et al., 1981; Colditz et al., 1985). A ação inibidora nas mucosas contra úlceras gástricas (Moszik et al., 1989 e Jávör et al., 1983) e a capacidade em prevenir a fotossensibilização em certas doenças de pele fotossensível (Mathews-Roth, 1981) são outras das atuações fisiológicas atribuídas aos carotenóides.

Em estudos com animais e "in vitro", foram encontradas fortes evidências de que, tanto β -caroteno como outros carotenóides não provitamínicos, aumentam a resposta imunológica, diminuindo o risco de infecções por bactéria e vírus (Bendich, 1990).

Com base nas atividades anti-câncer e anti-gástrica de alguns carotenóides, Khacik et al. (1986) e Rodriguez-Amaya (1985) reforçam a necessidade e a importância da determinação da composição completa de carotenóides em alimentos.

2.2 - Biossíntese dos Carotenóides

Uma vez que as plantas são capazes de biossintetizar carotenóides, sua composição é enriquecida pela presença de quantidades pequenas ou traços de precursores biosintéticos ou de de-

rivados dos principais componentes (Rodriguez-Amaya, 1991). Portanto, para apreciar melhor a composição, o conhecimento dos caminhos biossintéticos é necessário.

A biossíntese de carotenóides compartilha etapas comuns à biossíntese de todas as classes de terpenóides, que se inicia com o acetato (Figura 1). Este sofre sucessivas reações, passando pela formação de unidades isoprenóides de 5 carbonos, até a obtenção do geranylgeranylpirofosfato (GGPP), que contém 20 carbonos. A partir daí, começam as etapas relacionadas exclusivamente com a biossíntese dos carotenóides: formação de fitoeno, dessaturação, ciclização, hidroxilação, etc.

O fitoeno é basicamente formado pela junção de duas moléculas de GGPP, que sofre uma série de reações de dessaturação que dão origem ao fitoflueno, ξ -caroteno ou seus isômeros assimétricos, neurosporeno e, finalmente, licopeno. Ainda persistem dúvidas de qual intermediário acíclico, licopeno ou neurosporeno, sofre ciclização. Porém, ambos poderiam seguir o mesmo mecanismo de ciclização (Britton, 1988).

No final da sequência biossintética, podem ser introduzidos grupos hidroxilas no carbono 3 do anel do carotenóide, originando α - e β -criptoxantina, luteína e zeaxantina. A epoxidação da luteína leva à formação de 5,6-monoepóxi-luteína e a da zeaxantina, à anteraxantina e violaxantina (Goodwin, 1966).

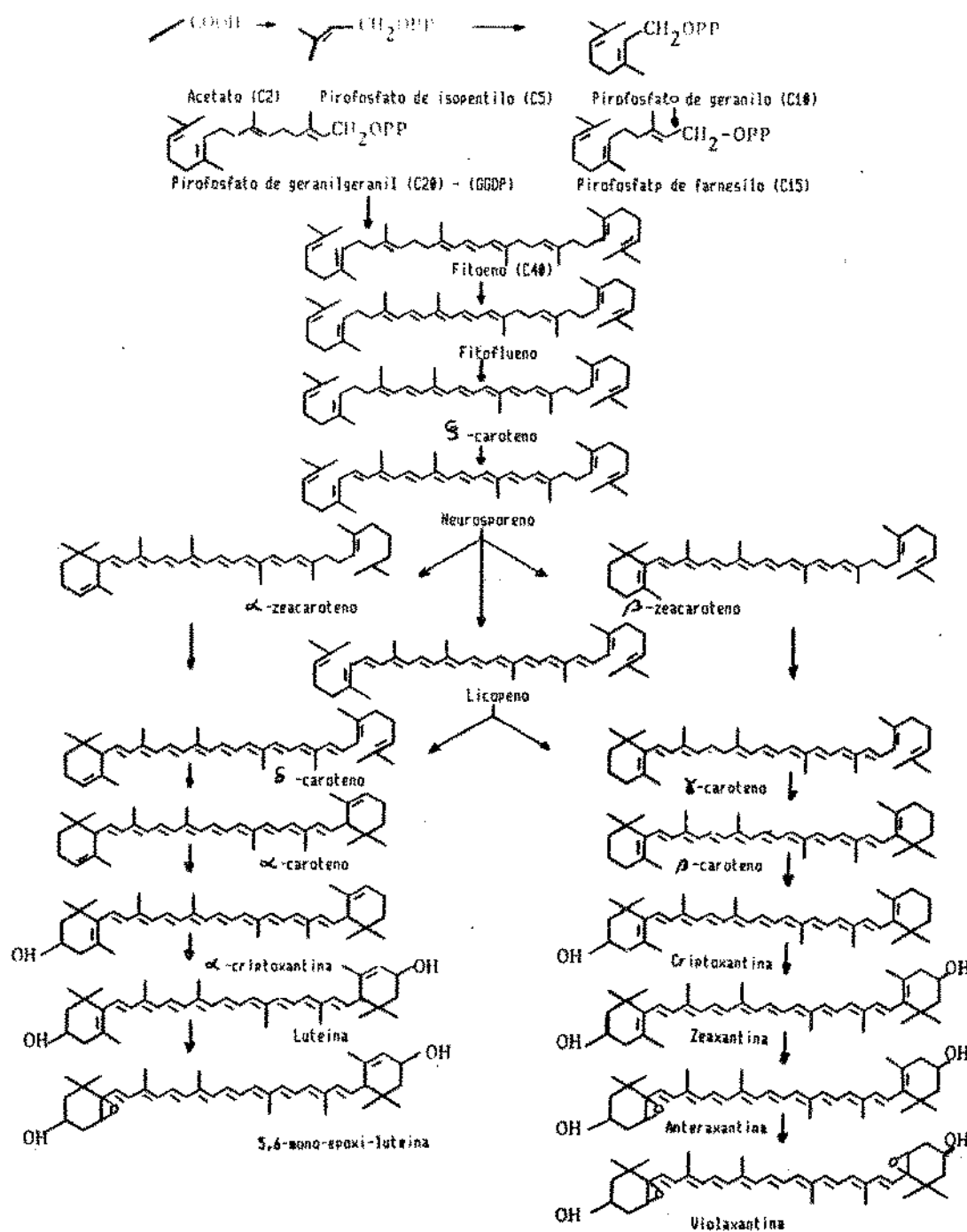


Figura 1 - Biossíntese de carotenóides

(Referências: Goodwin, 1966 Bauernfeind, 1972)

2.3 - Carotenóides de Cenoura

2.3.1 - Composição completa

Os carotenóides de cenoura têm sido alvo de muita pesquisa sob vários aspectos: biossíntese, funções nutricionais e biológicas, composição e cor de alimentos, bem como o desenvolvimento de métodos.

A composição quali e quantitativa de carotenóides, em cenoura, varia marcadamente dentre e entre as diversas variedades, cultivares e linhagens, assim como entre as várias regiões e tecidos da raiz (Bills e Macdonald, 1932; Strain, 1939; Harper e Zscheile, 1945; Rygg, 1949; Booth, 1951; Laferriere e Gabelman, 1968; Iman e Gabelman, 1968; Umiel e Gabelman, 1971 e 1972; Buis-hand e Gabelman, 1979; Simon e Wolff, 1987; Heinonen, 1990).

A coloração dos diversos "tipos" de cenoura pode ir da chamada cenoura branca, passando por várias nuances de amarelo e laranja, e chegando até ao vermelho. O conteúdo total de carotenóides pode variar de 200 $\mu\text{g}/100\text{g}$ para as cenouras brancas (Laferriere e Gabelman, 1968), até valores acima de 37100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ para as variedades laranja (Dark e Booth, 1946).

As cenouras mais intensamente coloridas são as mais desejáveis comercialmente, não somente por sua melhor aparência, como também pelo alto valor nutritivo (Iman e Gabelman, 1968), às vezes indevidamente atribuído.

Os principais carotenóides das cenouras laranja são α - e β -caroteno que, somados, podem variar de 80 a 90% do total de carotenóides. O restante é formado por xantofilas e pigmentos po-

liênicos não coloridos (Harper e Zscheile, 1945; Iman e Gabelman, 1968; Laferriere e Gabelman, 1968; Umiel e Gabelman, 1971 e 1972; Baloch et al., 1977a; Ogunlesi e Lee, 1979; Lee, 1986).

Nas variedades amarelas e brancas, os principais carotenóides são as xantofilas, variando entre 74 a 95% dos carotenóides totais (Laferriere e Gabelman, 1968). Dependendo da variedade e/ou quantidade analisada, α - e/ou β -caroteno podem não ser detectados (Buishand e Gabelman, 1979).

Já na cultivar vermelha "Kintoki", o licopeno é o principal pigmento, sendo a quantidade de β -caroteno variável. Embora seja a cenoura mais intensamente colorida, seu conteúdo de carotenóides totais, 16000 $\mu\text{g}/100\text{g}$, não é o mais alto (Umiel e Gabelman, 1971 e 1972; Yamaguchi e Sugyama, 1960).

A grande maioria dos trabalhos com carotenóides de cenoura se restringe à determinação de α - e β -caroteno e/ou carotenóides totais (Bills e Macdonald, 1932; Emsweller, et al., 1935; Dark e Booth, 1946; Rygg, 1949; Booth, 1951; Weckel et al., 1962; Della-Monica e Macdowell, 1965; Iman e Gabelman, 1968; Laferriere e Gabelman, 1968; Sweeney e Marsh, 1971b; Arya et al., 1979; Bushway e Wilson, 1982; Hsieh e Karel, 1983; Bushway, 1985; Bureau e Bushway, 1986; Bushway, 1986; Bushway et al., 1986; Isaksen e Francis, 1989).

Outros autores se preocuparam em separar os isômeros de α - e/ou β -caroteno (Panalaks e Murray, 1970; Sweeney e Marsh, 1971a,b; Ogunlesi e Lee, 1979; Schwartz e Killam-Patroni, 1985; Chandler e Schwartz, 1987; Quackenbush, 1987).

Os trabalhos mais completos estabeleceram a composição dos principais carotenóides, porém, a composição completa, nunca.

A Tabela 1 reúne esses trabalhos e os carotenóides encontrados.

2.3.2 - Valor de vitamina A

A cenoura é conhecida como uma das mais notáveis fontes de α - e β -caroteno e, como conseqüência, tradicionalmente considerada um vegetal de alto valor provitamínico A.

A avaliação individual desses dois principais carotenos é muito importante, pois o α -caroteno varia substancialmente (5 a 46%), (Goodwin, 1954), além de possuir a metade da atividade provitamínica do β -caroteno. A não separação de ambos pode causar uma superestimação do valor de vitamina A em até 25% (Harper e Zscheile, 1945).

Bushway e Wilson (1982) compararam os valores de vitamina A de diversos vegetais (entre eles cenoura) pelo método da AOAC que não separa α - e β -caroteno, com um método utilizando HPLC que os isola, e obtiveram 23338 e 18087 UI/100g, respectivamente.

A Tabela 2 reúne alguns trabalhos que efetuaram a separação de α - e β -caroteno com os respectivos valores de vitamina A calculados, quando os textos originais não o fizeram.

A incidência de isômeros cis de α - e β -caroteno em cenouras "in natura" varia, podendo não ser detectados ou estar presentes em pequenas quantidades (Kemmerer e Fraps, 1945; Harper e Zscheile, 1945; Schwartz e Killam-Patroni, 1985; Chandler e

Tabela 1 - Carotenóides encontrados em cenoura

Variedade, Cultivar ou Linhagem (cor)	Carotenóides encontrados	Referências
Não especificada (cor não citada)	3,4,6 e 7	Strain, 1939
Danvers Half Longa (laranja clara)	3,4,5,6,11 e 13	Harper e Zscheile, 1945
Não especificada (variação de amarelo claro à vermelho escuro)	3,4,6,13 e/ou 14	Sadana e Ahmad, 1947
MC 501b (amarela) e W 93 Bc (laranja)	2,3,4,5,6,11,13 e 14	Umiel e Gabelman, 1971 e 1972.
Kintoki KIRb, KDSb e KDM (vermelhas)	2,4,5,6,11,13 e 14	
Não especificada (cor não citada)	2,3,4,5,6,8,9,11,12,13 e 14	Baloch et al., 1977a,c
B 61006-3a e LMGa (brancas) e YELa (amarelo)	13 e 14	Baishand e Gabelman, 1979
YEL 1a (amarelo)	2,4,13 e 14	
L66a e RRa (amarela)	2,4,5,13 e 14	
W 93 A 2c e Vita Longaa (laranja)	2,3,4,5,6,11,13 e 14	
Chantenaya (cor não citada)	1,2,3,4,5,6,8,10,11,13 e 14	Ogunlesi e Lee, 1979
PY 601a (cor não citada)	2,3,4,5,6,10,11,13 e 14	Edwards e Lee, 1986
Não especificada (cor não citada)	1,2,3,4,5,6,8,10,11,13 e 14	Lee, 1986
B 6274b (laranja) e HCNb (laranja escuro)	3,4,5,6,10,11,13 e 14	Simon e Wolff, 1987
A PLUSc (cor não citada)	3,4,5 e 11	Khachik e Beecher, 1987
Não especificada (cor não citada)	3,4 e 15	Heinonen et al., 1989
Bangor FIBZb, Bergen FIBZb, Berlicum W e Rb, Casey FIBZb, Chantenay Rb, Flakker 6 e Rb, Flaxton FIBZb, Florence FIBZb, Fontana FIBZb, Nairobi FIBZb, Nantes Duke Notabene 370b, Nantes Fancy Notabene 405b, Nantucket FIBZb, Napoli FIBZb, Marbonne FIBZb, Nelson FIBZb, e Rondino FIBZb (todas laranja)	3,4,6 e 12	Heinonen, 1990

- | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| 1 - Fitoeno | 5 - δ -caroteno | 9 - Cis-neurosporeno | 13 - Mono hidroxicarotenóide não identificado |
| 2 - Fitoflueno | 6 - γ -caroteno | 10 - β -zeacaroteno | 14 - Poli hidroxicarotenóide não identificado |
| 3 - α -caroteno | 7 - ϵ -caroteno | 11 - Licopeno | 15 - Luteína e zeaxantina |
| 4 - β -caroteno | 8 - neurosporeno | 12 - Luteína | |

Tabela 2 - Variação do valor de vitamina A em cenouras.

Variável investigada	Conteúdo de α -caroteno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Valores de vitamina A (RE/100g)	Referências
Seis variedades híbridas e seus cruzamentos (cenouras amarelo-limão, amarelas, laranja claro e laranja)	0-3700 ^{b,d}	3-6410 ^{b,d}	0-1383 ^e	Iwan e Gabelman, 1968
Doze variedades e linhagens e seus cruzamentos (cenouras brancas, amarelas, "orange tinge", laranja médio e laranja)	0-5810 ^{b,d}	0-7620 ^b	0-1754 ^e	Laferriere e Gabelman, 1968
Relação da perda de sólidos Solúveis com o conteúdo de carotenóides	2240 ^{b,d}	8640 ^{b,d}	1620 ^e	Balock et. al., 1977a
Determinação de α e β caroteno de 20 amostras de cenoura	2000-5700 ^b	4600-12500 ^b	933-2575 ^{e,d}	Bushway e Wilson, 1982
Determinação de α e β caroteno de cenouras compradas no mercado local	20830 ^{b,d}	41760 ^{b,d}	8696 ^e	Hsieh e Karel, 1983
Determinação de α e β caroteno de cenouras de 5 origens diferentes colhidas em março, julho e novembro	-	-	258-2644	Bureau e Bushway, 1986
Determinação de α e β de cenouras de 3 origens diferentes	3160-5157 ^b	5841-11500 ^b	8696 ^e	Bushway, 1986
Comparação do conteúdo de α e β -caroteno de 26 amostras obtidas em supermercados e 43 em bancas de beira de estrada	2957-3053 ^b	3606-4003 ^b	855-914	Bushway et al., 1986
Medida de carotenóides provitamínicos em cenouras da variedade PY 60	358-387 ^{a,d}	752-800 ^{a,d}	155-166 ^e	Edwards e Lee, 1986
Mudanças no conteúdo de carotenóides de cenouras estocadas de 5 a 158 dias	1850-2110 ^{b,d}	5490-5820 ^{b,d}	1067-1146 ^e	Lee, 1986

Carotenóides provit- amínicos em cenouras comercializadas em São Paulo, Brasil	2467 ^b	4584 ^b	936	Almeida e Pentzado, 1987
Composição de carote- nóides em 3 linhagens de cenoura	3200-29600 ^{b,d}	5200-25100 ^{b,d}	1133-5900 ^e	Simon e Wolff, 1987
Conteúdo de carotenó- ides de cenoura durante				Heinonen, et.al., 1989
inverno	530-2200 ^b	4600-7700 ^b	811-1650 ^e	
verão	2400-2900	2600-5500	633-1158	
Composição de carote- nóides e valor de vi- tamina A de 19 culti- vares de cenoura	2200-4900 ^b	4600-10300 ^b	1200-2300 ^e	Heinonen, 1990

a - Base Seca

b - Base Úmida

c - Valores originalmente fornecidos em UI/100g

d - Valores originalmente fornecidos em mg/100g

e - Valores calculados a partir do conteúdo de β -caroteno

Schwartz, 1987).

Mesmo os trabalhos que separaram os isômeros de β -caroteno, na maioria, não efetuaram a separação dos isômeros de α -caroteno e, no caso da cenoura, isso pode levar a erros no cálculo final do valor de vitamina A. A biopotência das formas cis são 3 a 4 vezes menores que a da forma trans (Zechmeister, 1949).

A principal forma de apresentação desses isômeros na literatura está expressa em termos de porcentagem da fração total de α - ou β -caroteno. Muitas vezes, o conteúdo da fração total não é relatado, impossibilitando o cálculo do valor correspondente de vitamina A.

Para o cálculo correto dos valores dos isômeros e suas transformações para valor de vitamina A, devem ser considerados os coeficientes de absorção e os fatores de conversão correspondentes a cada forma isomérica (Tabela 3).

Kemmerer e Fraps (1945), analisando 7 amostras de cenouras frescas cultivadas no Texas, encontraram um exemplar contendo pequenos teores de 13- e 9-cis- β -caroteno (1,3 e 4,0%, respectivamente), uma amostra contendo somente o primeiro (3,5%) e duas contendo somente o segundo isômero (2,1 e 5,6%). As outras três cenouras não continham isômeros cis. É interessante notar que os mesmos autores, 1943, não atribuíram qualquer atividade vitamínica ao 9-cis- β -caroteno, citado como neo β -caroteno U.

Em um trabalho estudando o efeito de processamentos no conteúdo de isômeros de β -caroteno, Panalacks e Murray (1970), separaram e calcularam 13- e 9-cis- β -caroteno, encontrando, res-

Tabela 3 - Valor de provitamina A e coeficientes de absorção de estereoisômeros de α - e β -carotenos

Isômero	Absorbância ^a		Biopotência(%)
	Máximo (nm)	1 % E 1 cm	
neo α -caroteno U (9-cis- α -caroteno)	449	2360	38
neo α -caroteno V	441	-	-
trans α -caroteno	450	2480	100
neo α -caroteno B (13-cis- α -caroteno)	444	1930	53
neo β -caroteno C	432	-	-
neo β -caroteno D	441	-	-
neo β -caroteno E	445	-	-
neo β -caroteno U (9-cis- β -caroteno)	437	-	13
trans β -caroteno	447	2640	53
neo β -caroteno B (13-cis- β -caroteno)	442	-	16

^a - Coeficientes de absorção de isômeros de α -caroteno determinados em 1,5% de p-metilanisol em éter de petróleo e isômeros de β -caroteno em 0,5% de p-metilanisol em éter de petróleo

(Referências: Zechmeister, 1962; Sweeney e Marsh, 1970)

pectivamente, 13,1 e 100 ug/100g, para as amostra não processadas, em matéria seca. O conteúdo de trans- β -caroteno foi de 603 ug/100g de matéria seca. Consideraram os coeficientes de absorção e as biopotências correspondentes a cada isômero e concluíram que, juntamente com a não quantificação individual de α - e β -caroteno, a desconsideração das diferentes formas isoméricas do último pode acarretar uma superestimação maior que 37% no cálculo final do valor de vitamina A.

Analisando novamente o efeito de processamentos, Sweeney e Marsh (1971a) determinaram a composição isomérica de α - e β -caroteno de cenouras frescas e após o processamento. Utilizaram seis lotes diferentes, sendo dois da variedade Danvers, dois da variedade Chantenay e dois de variedades não especificadas. Nas cenouras "in natura", encontraram uma variação de 1,0 a 1,8% de 13-cis- α -caroteno e de 0,0 a 0,9% para o 9-cis- α -caroteno. Para a fração de β -caroteno, a variação foi de 2,9 a 10,2% de 13-cis- β -caroteno e 1,0 a 1,8% de 9-cis- β -caroteno.

Os mesmos autores (1971b), com o objetivo de avaliarem a influência da utilização de dois herbicidas sobre duas variedades de cenoura no teor de provitamina A, encontraram uma variação para a fração de 13-cis- α -caroteno de 1,3 a 2,4% e para o 9-cis- α -caroteno de 0,3 a 0,9%; para os isômeros 13- e 9-cis do β -caroteno, a variação foi de 3,2 a 5,4% e 1,1 a 1,8%, respectivamente.

Nêsses dois trabalhos de Sweeney e Marsh, os valores correspondentes de vitamina A não foram calculados.

Ogunlesi e Lee (1979), avaliando o efeito do processamento térmico na isomerização dos principais carotenóides e no valor de vitamina A da cenoura, apresentaram uma comparação dos valores dos isômeros, calculados com e sem a correção das respectivas biopotências (Tabela 4).

Com o objetivo de analisar os principais carotenóides com atividade provitamínica A de cenouras, assim como a diminuição desse valor após cozimento, Almeida e Penteado (1987) encontraram somente os isômeros 13-cis- de α - e β -caroteno (3,2 e 3,5%, respectivamente), não encontrando os isômeros 9-cis.

Testando colunas e solventes para uma análise rápida de isômeros 9-cis-, 13-cis- e trans- do β -caroteno em alimentos comuns, por cromatografia líquida de alta eficiência, Quackenbush (1987) encontrou, para cenoura fresca, 1,2% do isômero 13-cis- e 0,4% do 9-cis- β -caroteno.

Sweeney e Marsh (1970) observaram que os vegetais amarelo-laranja contêm o isômero 13-cis- em maior quantidade que o 9-cis- β -caroteno. Isso pode ser confirmado pela observação dos dados dos trabalhos anteriormente citados, com uma pequena exceção no de Kemmerer e Fraps (1945), onde foi encontrada uma cenoura que continha somente 9-cis- β -caroteno.

Tabela 4 - Concentração de isômeros de α - e β -caroteno de cenouras enlatadas com e sem correção das respectivas biopotências

Isômero	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca)	
	sem correção	com correção ^a
13-cis- α -caroteno	1,8	0,3
trans- α -caroteno	145,8	77,3
9-cis- α -caroteno	0,7	0,1
13-cis- β -caroteno	9,2	4,9
trans- β -caroteno	291,8	291,8
9-cis- β -caroteno	2,5	1,0

^a - Os valores corrigidos foram obtidos pela multiplicação dos dados sem correção pelas respectivas biopotências (Tabela 3) e multiplicados por 100.

(Referência: Ogunlesi e Lee, 1979)

2.4 - Carotenóides de Espinafre

2.4.1 - Composição completa

Os principais pigmentos das plantas superiores verdes são β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina, sendo que α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina e anteraxantina também podem aparecer em pequenas quantidades (Goodwin, 1976). Em alface (Rochaud et al., 1985), e em diversas hortaliças consumidas no Brasil (Ramos e Rodriguez-Amaya, 1987; Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1990), foram detectados traços de α -criptoxantina ao invés de β -criptoxantina.

A violaxantina, que acompanha a luteína (Kuhn et al., 1931), muitas vezes é relatada como epóxido de luteína (Karrer et al., 1948), embora alguns autores (Braumann e Grimme, 1981; Khachik et al., 1986; Daood et al., 1989) tenham encontrado violaxantina e epóxido de luteína na mesma amostra. Isoluteína, luteoxantina, neocromo e γ -caroteno foram detectados nas folhas de abacate (Gross et al., 1973). Isômeros de alguns dos pigmentos também foram relatados (Khachik et al., 1986; Daood et al., 1989).

Como as outras hortaliças folhosas, o espinafre tem a composição qualitativa de carotenóides bem estabelecida (Tabela 5).

Em termos quantitativos, tem, como principal carotenóide, a luteína, seguida pelo β -caroteno (Hirayama e Oido, 1969; Khachik et al., 1986; Heininen et al., 1989). O α -caroteno já foi encontrado em pequenas quantidades (Wall e Kelley, 1943; Pol et

Tabela 5 - Carotenóides encontrados em espinafre

Variáveis investigadas	Carotenóides encontrados	Referências
Mudanças na composição de pigmentos de espinafre sob diversas condições de estocagem	2,4,6,7 e 8	Hirayama e Oido, 1969
Estudos preliminares na separação de pigmentos de plantas por HPLC	2,4,6 e 7	Eskins et al., 1977
Resultados preliminares para micro-método usando HPLC	2,4,6 e 7	Iryama et al., 1978
Método de separação e quantificação, por HPLC, de clorofilas e carotenóides de espinafre	2,4,6,7,8 e 9	Stransky, 1978
Descrição de sistema cromatográfico de fase reversa por HPLC	1,2,4,5,6,7 e 9	Braumann e Grisse, 1981
Método quantitativo para carotenóides de espinafre	2,4,5,6 e 7	Kakutani et al., 1983
Separção, identificação e quantificação dos principais carotenóides de vegetais verdes por HPLC.	2,3,4,5,6,7,10,11,12, 13,14 e 15	Khachik et al., 1986
Substituição de sistema de 2 solventes por 1 solvente em separação por HPLC	2,4,6 e 7	Kakutani e Kitu, 1988
HPLC de carotenóides de vegetais	2,4,5,6,7 e 13 ou 14 ou 15	Daood et al., 1989
Variação de α -caroteno e luteína de espinafre de diferentes origens e épocas do ano	2,4 e 8	Heinonen, 1989
Método rápido e fácil para separação de pigmentos de folhas por TLC	2,4,6 e 7	Iryama et al., 1990

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1 - α -caroteno | 9 - Antheraxantina |
| 2 - β -caroteno | 10 - Neocromo |
| 3 - 15,15' cis β -caroteno | 11 - 9 cis neoxantina |
| 4 - Luteína | 12 - cis epóxido de luteína |
| 5 - Epóxido de luteína | 13 - Neo luteína B |
| 6 - Violaxantina | 14 - Neo luteína B' |
| 7 - Neoxantina | 15 - Neo luteína A |
| 8 - Zeaxantina | |

al., 1988).

2.4.2 - Valor de vitamina A

Devido ao alto teor de β -caroteno, uma grande variedade de hortaliças folhosas comercializadas no Brasil (Ramos e Rodriguez-Amaya, 1987), de consumo mais restrito no norte do Brasil (Penteado et al., 1986), e algumas folhas nativas brasileiras (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1990) podem ser consideradas fontes ricas de provitamina A. O espinafre, que foi analisado num trabalho de comparação de métodos (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1989), possui alto teor de β -caroteno, podendo, conseqüentemente, ser considerado um bom fornecedor de provitamina A.

A determinação de vitamina A em hortaliças folhosas é relativamente simples. O único carotenóide com atividade vitamínica presente em quantidades consideráveis é o β -caroteno. α -caroteno e α -criptoxantina, quando presentes, estão em pequenas quantidades e não vão afetar consideravelmente o valor final de vitamina A (Rodriguez-Amaya, 1989).

A Tabela 6 resume alguns trabalhos sobre o valor de vitamina A em espinafre.

Assim como para a cenoura, uma determinação mais exata desse valor requer a separação dos isômeros do β -caroteno. Grande parte dos poucos trabalhos realizados apresentam a porcentagem dos isômeros em função da fração total do β -caroteno e não calculam o valor de vitamina A.

Os isômeros 13-cis- β -caroteno e 9-cis- β -caroteno do espinafre "in natura" podem variar de 3,2 a 10,4% e de 7,4 a

Tabela 6 - Valores de vitamina A em espinafre

Variáveis investigadas	Conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Valor de Vitamina A (RE/100g)	Referências
Comparação entre 3 métodos de separação de carotenos	7430-8700 ^{a,b}	1238-1463 ^c	Wall e Kelley, 1943
Determinação do conteúdo de β -caroteno do espinafre branqueado e não branqueado, estocado por 354 dias a -20°C	680-5560 ^b	147-927 ^c	Zscheile et al., 1943
Mudanças na composição de carotenóides sob diversas condições de estocagem	400-7500 ^b	67-1250 ^c	Hirayama e Oido, 1969
Análise quantitativa de carotenóides por HPLC	940	157 ^c	Kakutani et al., 1983
Determinação de carotenóides totais em vegetais nigerianos, entre eles espinafre africano	12600 ^b	2100 ^c	Akpapunna, 1984
Separção, quantificação e identificação dos principais carotenóides utilizando HPLC	6710 ^b	1118 ^c	Khachik et al., 1986
Determinação de β -caroteno de espinafre de diferentes origens colhidos em março, junho e novembro	-	380-1555	Bureau e Bushway, 1986
Determinação de α e β -caroteno por HPLC em vários vegetais e frutas "in natura"	3842-5323 ^b	640-887 ^c	Bushway, 1986
HPLC para separação simultânea de carotenóides e clorofilas	6110 ^b	1018 ^c	Daood et al., 1989
Determinação de carotenóides e valor de vitamina A em vários alimentos comuns na dieta	3300 ^b	550	Heinonen et al., 1989
Comparação de métodos para determinação de valor de vitamina A	3102 ^b	517 ^c	Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1989

a - Contém α -caroteno

b - Base úmida

c - Valores calculados a partir do conteúdo de β -caroteno

12,5%, respectivamente (Sweeney e Marsh, 1971a,b; Schwartz e Kil- lam-Patroni, 1985; Chandler e Schwartz, 1986; Quackenbush, 1987). Esses valores estão de acordo com a observação de Sweeney e Marsh (1971a) de que os vegetais verdes possuem teores de 9-cis- β -caroteno maiores que o 13-cis- β -caroteno.

Num relato que estuda alguns alimentos comuns na Indo- nésia, entre eles o espinafre d'água, Pol et al. (1988) sugeriram um fator de correção de 0,9 que, multiplicado pelo conteúdo de β -caroteno total, retificaria esse valor em função da perda de provitamina causada pela transformação de isômeros cis.

Deve-se salientar que existe uma diferença entre os espinafres relatados na literatura internacional e nacional. O espinafre americano tem, como característica, folhas grandes e verde-escuras, arranjadas em forma de cabeça (Tiedjens, 1943). O espinafre cultivado no Brasil, chamado espinafre da Nova Zelân- dia, é uma planta com várias hastes rasteiras, onde folhas peque- nas e em forma de losango se prendem.

2.5 - Degradação de Carotenóides e Perda do Valor de Vitamina A Durante a Desidratação e a Liofilização

2.5.1 - Fatores que influenciam a degradação

Os carotenóides são compostos extremamente susceptíveis às reações oxidativas devido ao alto grau de insaturação das ligações. Nas frutas e vegetais "in natura", a estrutura celular e a complexação com proteínas lhes conferem uma certa estabilidade. Durante as várias etapas do processamento, essa ultraestrutura e os complexos podem ser quebrados, expondo os carotenóides a fatores adversos, levando-os à sua destruição. A estabilidade varia largamente no processamento e na estocagem, dependendo da temperatura, disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, atividade de água, acidez, presença de metais (Chichester e Mcfeeters, 1971) e da própria estrutura (Chichester e Mcfeeters, 1971; Godoy e Rodriguez-Amaya, 1987; Padula e Rodriguea-Amaya, 1987). A presença de agentes antioxidantes naturais, como ácido ascórbico e tocoferol, retardam a oxidação (Bauernfeind, 1981).

2.5.2. - Tipos de degradação

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre a degradação de carotenóides se baseia apenas na diminuição da absorção óptica a 459 nm. Os resultados não esclarecem as perdas individuais, nem as mudanças ocorridas. Sabe-se, apenas, que as etapas iniciais da degradação são a isomerização e a formação de epóxidos.

Na natureza, normalmente, os carotenóides se apresentam na forma trans. A formação de estruturas cis é considerada etapa de degradação, embora existam isômeros cis que ocorram naturalmente, como o cis-fitoeno, os pigmentos poli-cis do tomate (Goodwin, 1954) e cis- β -caroteno na cenoura (Khachick e Beecher, 1987).

Durante alguns processamentos, o aquecimento causa uma redistribuição dos constituintes dos alimentos, podendo, mais comumente em frutas, liberar ácidos. Essas condições favorecem a isomerização para a forma cis, frequentemente nas posições 9 ou 13, obtendo-se, assim, uma mistura de isômeros (Moss e Weedon, 1976). Como conseqüência, ocorre uma diminuição na intensidade da cor, nem sempre distinguida pelo olho humano (Curl e Bailey, 1956; Deuel, 1957 e Weckel et al., 1962), além da diminuição do valor de vitamina A (Zechmeister, 1949; Deuel, 1957).

A oxidação é a principal causa de degradação dos carotenóides. A reação parece que se inicia com o ataque do oxigênio ao anel do pigmento. El-Tinay e Chichester (1970), apoiados posteriormente por outros autores (Huet, 1979; Stefanovich e Karel, 1982; Chou e Breene, 1972) consideraram o mecanismo de oxidação dos carotenóides compatível com a formação de radicais livres, uma vez que a adição de um inibidor desses radicais deteve a oxidação.

Os epóxidos são considerados os produtos iniciais da oxidação. O mais comumente encontrado é o 5,6-monoepóxido que, na presença de ácido, com ou sem aquecimento, pode transformar-se num 5,8-monoepóxido (Chan et al., 1975; Dalal e Lunkhe, 1964).

A epoxidação do β -caroteno causa alteração no grupo cromóforo, também tendo, como consequência, a perda de cor e valor de vitamina A, além de ser associado com o desenvolvimento de "off-flavors" (Weier, 1944; Mackinney et al., 1958; Baloch et al., 1977b; Arya et al., 1979 e 1982; Park, 1987). A fragmentação dos produtos primários de oxidação produzem um complexo de compostos similares àqueles encontrados na oxidação de ácidos graxos (Tannenbaum, 1976).

A Figura 2 esquematiza os possíveis caminhos da degradação do β -caroteno.

2.5.3 - Alterações durante o processo de desidratação

Dos vários tipos de processamento, a desidratação é considerada a mais prejudicial em termos de carotenóides. Devido ao aumento da superfície de contato (Klaur e Bauernfeind, 1981) e diminuição da quantidade de água (Kimura e Shioda, 1963), o alimento fica mais exposto à ação de agentes externos como o oxigênio.

A quantidade de água é crítica na estabilização dos carotenóides. O decréscimo de umidade tende a estabilizar os carotenóides até um valor limite, a partir do qual, essa estabilidade decresce rapidamente. Admite-se a hipótese de que, quando um alimento desidratado possui um filme d'água, este age como barreira para o oxigênio, aumentando assim a estabilidade dos pigmentos (Kimura e Shioda, 1963; Goldblistl et al., 1963).

Polímeros, compostos voláteis, compostos de pe-
quenas cadeias solúveis em água

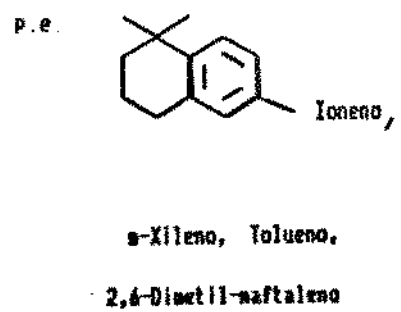
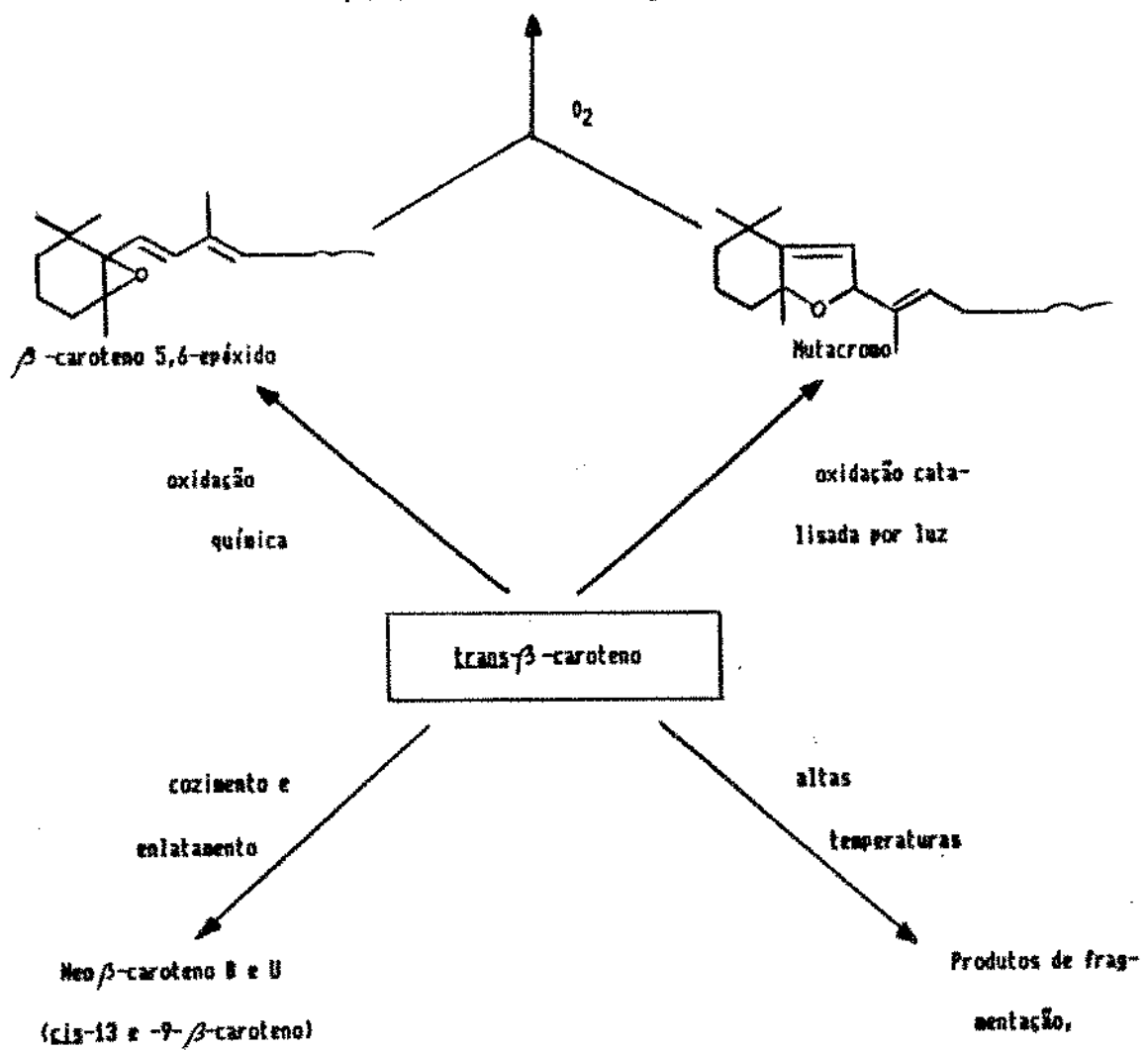


Figura 2 - Principais rotas de degradação do β -caroteno
(Referência: Tannenbaum, 1976)

Tomioaka et al. (1973) verificaram que, nas cenouras liofilizadas a 10% de umidade, os carotenóides eram mais estáveis que nas liofilizadas a 0% de umidade. Arya et al. (1979) estabeleceram uma faixa de 8,8-10,0% de umidade para melhor estabilidade, enquanto que Tomkins et al. (1944) verificaram uma menor oxidação em torno de 5,4% de umidade.

A perda de carotenóides, segundo Pararincevic-Trajkovic e Baras (1970), depende mais da presença de oxigênio do que da temperatura de secagem.

Na maioria dos trabalhos da literatura, pode-se observar que as maiores perdas ou mudanças ocorrem durante e pelas condições de estocagem e não tanto pelo processamento, tanto na liofilização como na desidratação.

Em goiaba liofilizada, a perda de β -caroteno durante o processamento e após de 18 meses de estocagem foi de 0,63 e 61,7%, respectivamente (Nogueira et al. 1978).

Mudanças no conteúdo de vitamina de frutas e vegetais liofilizados foram estudadas por Lempka e Prominski (1967). Observaram eles que o teor de carotenóides não foi afetado pelo processamento, porém, produtos estocados por diferentes tempos, sem vácuo, tiveram uma perda alta.

Popovskii et al. (1968) relataram que a liofilização preservou a qualidade do morango, apricot e pêssêgos, embora alguma vitamina C tenha sido perdida nos morangos e uma pequena quantidade de carotenos, no apricot.

Wong e Bohart (1957) observaram um aumento de licopeno, em pó de suco de tomate desidratado a vácuo, durante a estoca-

gem. Essa observação foi explicada por Miers et al. (1958) como sendo a retransformação do cis-licopeno, produzido durante o processamento, em trans-licopeno durante a estocagem. Lovric et al. (1970) relataram a restauração, durante a estocagem, da cor perdida por desidratação "foam-mat" de tomate.

Livingston et al. (1968), estudando as modificações que ocorrem com a composição de carotenóides em alfafa desidratada, em escala piloto e industrial, encontraram uma perda de 0 a 33% de carotenos, dependendo das condições do processamento. As perdas de xantofilas, de 28 a 73%, mostraram uma relação inversa com a umidade do produto final. Luteína foi a mais estável, sofrendo perdas de 21 a 74%. A neoxantina sofreu diminuição muito variável, de 15 a 94%, e a violaxantina, perdas consistentemente altas, de 65 a 87%.

2.5.4 - Desidratação de cenoura

A maioria dos trabalhos sobre modificações ocorridas na composição de carotenóides de cenoura desidratada se baseia na medida de carotenóides totais e/ou de β -caroteno. Alguns autores se preocuparam com a modificação da composição isomérica do β -caroteno. Existe uma discrepância nos resultados apresentados, com alguns trabalhos relatando aumentos e outros, perdas consideráveis.

Weier e Stocking (1946) avaliaram o efeito de vários antioxidantes no teor de carotenóides totais (base úmida) em cenouras desidratadas. Em todos os testes, incluindo cenouras sem tratamento e cenouras somente branqueadas, sempre houve diminuição dos carotenóides totais, com a perda chegando até 45%, após 168 horas de estocagem a 40°C.

Simon e Wolff (1987) compararam o conteúdo de α - e β -caroteno e de carotenóides totais de três variedades de cenoura, antes e após congelamento e liofilização. Concluíram que o aumento de β -caroteno e carotenóides totais, observado na cenoura liofilizada, foi devido a uma extração mais eficiente da amostra.

A porcentagem de β -caroteno, na base de sólidos totais da cenoura fresca, foi de 74, 81 e 88% para secagem convencional por ar quente, "explosive puffing" e liofilização (Della Monica e McDowell, 1965). Do mesmo modo, foi avaliada a variação somente da forma isomérica trans do β -caroteno. Cerca de 60% foi mantida na secagem convencional e "explosive puffing", enquanto e o produto liofilizado o reteve em torno de 80%.

Panalaks e Murray (1970) compararam as mudanças no conteúdo de carotenóides totais, α -caroteno e das formas isoméricas do β -caroteno na cenoura fresca e após o processamento (enlatamento e desidratação) e o cozimento. Os resultados foram fornecidos em base seca, havendo aumento do conteúdo de carotenóides totais e frações de α - e β -caroteno, nos dois processamentos e no cozimento.

Vários autores, que também constataram aumentos aparentes nos conteúdos de carotenóides totais e/ou de β -caroteno (Lee, 1945; Weckel et al., 1962; Baloch et al., 1977a,b; Ogunlesi e Lee, 1979), durante processamento, atribuíram-no a lixiviação causada pelo branqueamento. A diminuição da quantidade relativa de matéria seca (sólidos totais) aumenta a concentração relativa dos carotenóides (Weckel et al., 1962; Ogunlesi e Lee, 1979).

Utilizando a medida de carotenóides totais, Baloch et al. (1977a,b) observaram uma correlação entre a perda de sólidos solúveis nas diversas etapas que antecedem a secagem e a estabilidade dos carotenóides na cenoura, durante a desidratação e a estocagem. A destruição dos carotenóides aumentou com o lixiviação. O aparecimento de um pico com comprimento de onda menor que o pico principal a 449 nm, foi relacionado com a oxidação de carotenos. Os valores foram calculados com base em sólidos insolúveis para evitar problemas com aumento aparente.

O efeito da liofilização na formação de isômeros de β -caroteno de cenoura foi estudado por Sweeney e Marsh (1971a). Os valores encontrados demonstraram que não houve mudança na com-

posição isomérica durante a liofilização. Porém, o conteúdo de carotenóides totais foi um pouco menor para o produto liofilizado do que para a cenoura fresca. Os autores não descreveram o processo de liofilização e os resultados foram fornecidos em base úmida.

Park (1987), num trabalho que comparava conteúdo de carotenos de cenoura fresca com cenoura desidratada em estufa a vácuo, microondas e liofilizada, encontrou valores em torno de 50% menores para as amostras liofilizadas e desidratadas a vácuo e 40% menor para as desidratadas em microondas. O autor concluiu que a desidratação, independentemente do método, reduz significativamente os carotenos. A comparação foi feita em base seca, e nenhum tratamento de branqueamento, antes das desidratações, foi realizado.

2.5.5 - Desidratação de espinafre

Só foram encontrados dois trabalhos na literatura sobre desidratação de espinafre.

No primeiro, Gomez (1981) comparou três processos de desidratação natural (secagem à temperatura ambiente e secagem solar com e sem exposição aos raios solares) para várias hortaliças folhosas, entre elas o espinafre africano. Em cada processamento foram testadas amostras frescas (sem nenhum tratamento), branqueadas e branqueadas e sulfitadas. Os resultados foram calculados como porcentagem de retenção de carotenos em relação ao controle, em base seca. Para desidratação à temperatura ambiente (20-22°C por 4-6 dias), observaram que este processamento teve

menor nível de retenção, devido à contínua ação enzimática durante o longo período de secagem, mesmo para as amostras branqueadas (a vapor, 3 minutos) e sulfitadas (600 ppm, 1 minuto). Para a secagem solar, protegida dos raios solares, a amostra fresca reteve cerca de 13% mais carotenos que a branqueada, não havendo, praticamente, diferença em relação à branqueada e sulfitada.

No trabalho de Park (1987), que também compara três processos de desidratação (estufa a vácuo, microondas e liofilização), para espinafre, brócoli e cenoura, as perdas do espinafre foram de 29, 31 e 19%, respectivamente. Os conteúdos de carotenos foram dados em base seca e não houve nenhum tipo de branqueamento antes das desidratações. As perdas para o espinafre foram menores que para a cenoura.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Matéria Prima

A cenoura utilizada nos processamentos foi especificada pela indústria simplesmente como "tipo comercial", porém suas características gerais (forma cilíndrica, regular e sem ponta) correspondem às da cenoura de variedade Nantes.

As amostras frescas e branqueadas foram fornecidas cortadas em pequenos cubos. A amostragem, para o primeiro e segundo ensaios, foi realizada, coletando-se cerca de 200 g de cenoura em três pontos diferentes do lote, num total de 600 g. Para o terceiro ensaio, coletou-se cerca de 100 g de amostra, em dez pontos diferentes, perfazendo 1 kg. Após homogeneização, realizada em um multiprocessador doméstico ARND, duplicatas de aproximadamente 20 g foram retiradas para análise. No estudo de repetibilidade (reprodutibilidade no mesmo laboratório), foram utilizadas amostras de 20 e 50 g.

Para as amostras desidratadas, vários pontos nas câmaras de secagem e liofilização, correspondentes aos lotes frescos amostrados, foram escolhidos aleatoriamente, fornecendo um total de cerca de 100 g de cada amostra, para o primeiro e segundo ensaios. Para o terceiro ensaio, cerca de 200 g foram coletadas do mesmo modo. As amostras, em flocos, foram então trituradas em moinho modelo QUADRAMAT SENIOR - BRABENDER, até obtenção de granulção de 60 mesh. A partir daí, foram utilizadas cerca de 3 a 5

g para o primeiro e segundo ensaios, e 10 g para o terceiro. O lote total processado pesava cerca de 1 tonelada de cenoura, porém, a amostragem foi realizada na quantidade de um lote (não especificada pela indústria), necessária para o preenchimento de uma câmara de desidratação.

A variedade do espinafre também não foi especificada pela indústria. Contudo, pela análise visual, foi reconhecido como o espinafre da Nova Zelândia, que é o comercializado no Brasil e já descrito na revisão de literatura.

A amostragem foi realizada nos mesmos moldes da cenoura, mas em quantidades diferentes. O lote total processado foi somente de 50 kg, quantidade utilizada para um teste de liofilização e desidratação. Para o espinafre fresco, os três pontos de amostragem somaram 400 g. Após homogeneização, triplicatas de 20 g foram utilizadas para a análise. Como para a cenoura, os produtos desidratados foram amostrados ao acaso, fornecendo cerca de 200 g de cada amostra. Após trituração, triplicatas, pesando cada uma cerca de 1 g, foram utilizadas para a análise.

3.2 - Processamento Industrial

O fluxograma geral dos processamentos de desidratação e liofilização da cenoura e espinafre são mostrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Não foram fornecidos dados como tempo de branqueamento, de desidratação, de liofilização ou de imersão nas soluções

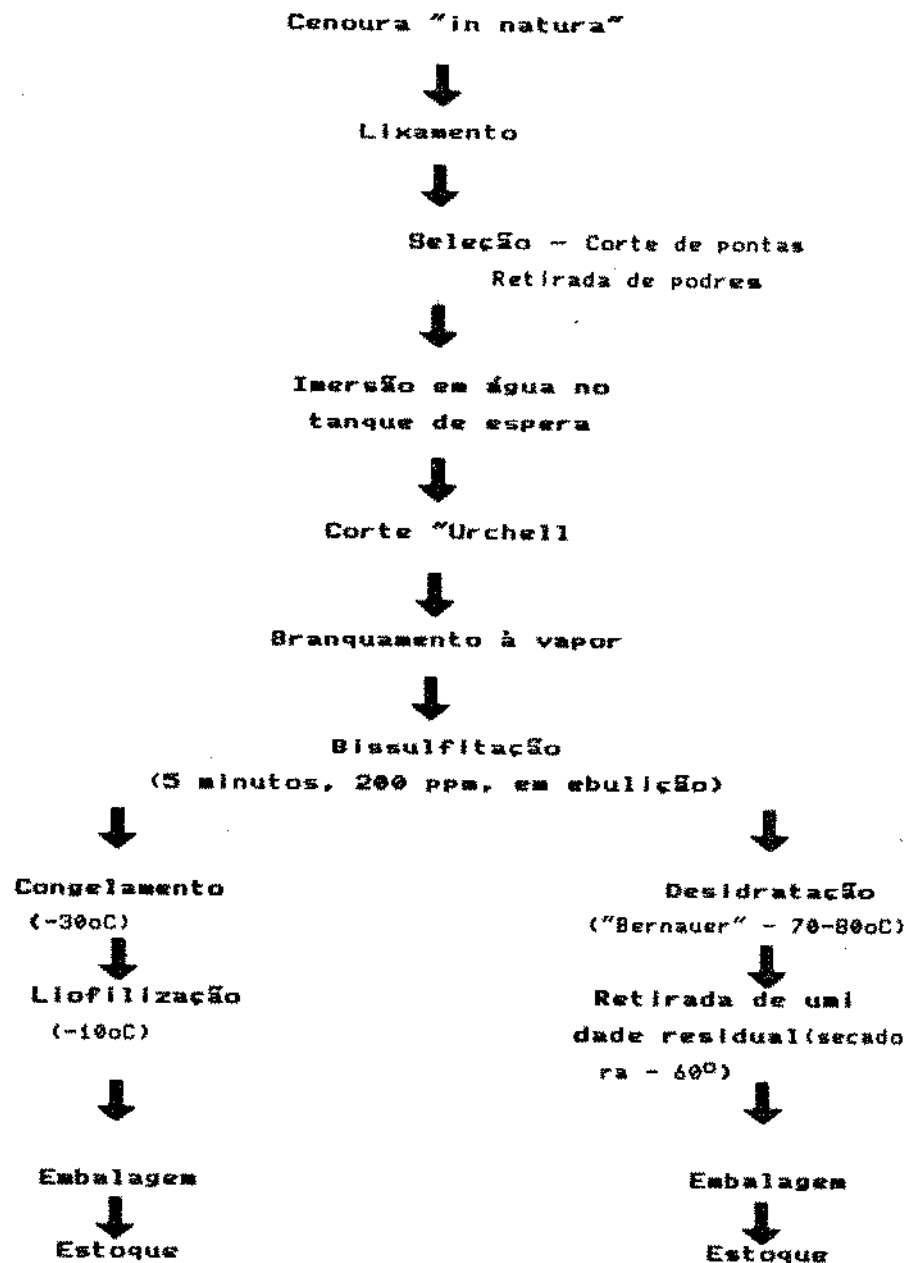


Figura 3 - Fluxograma de desidratação e liofilização da cenoura.

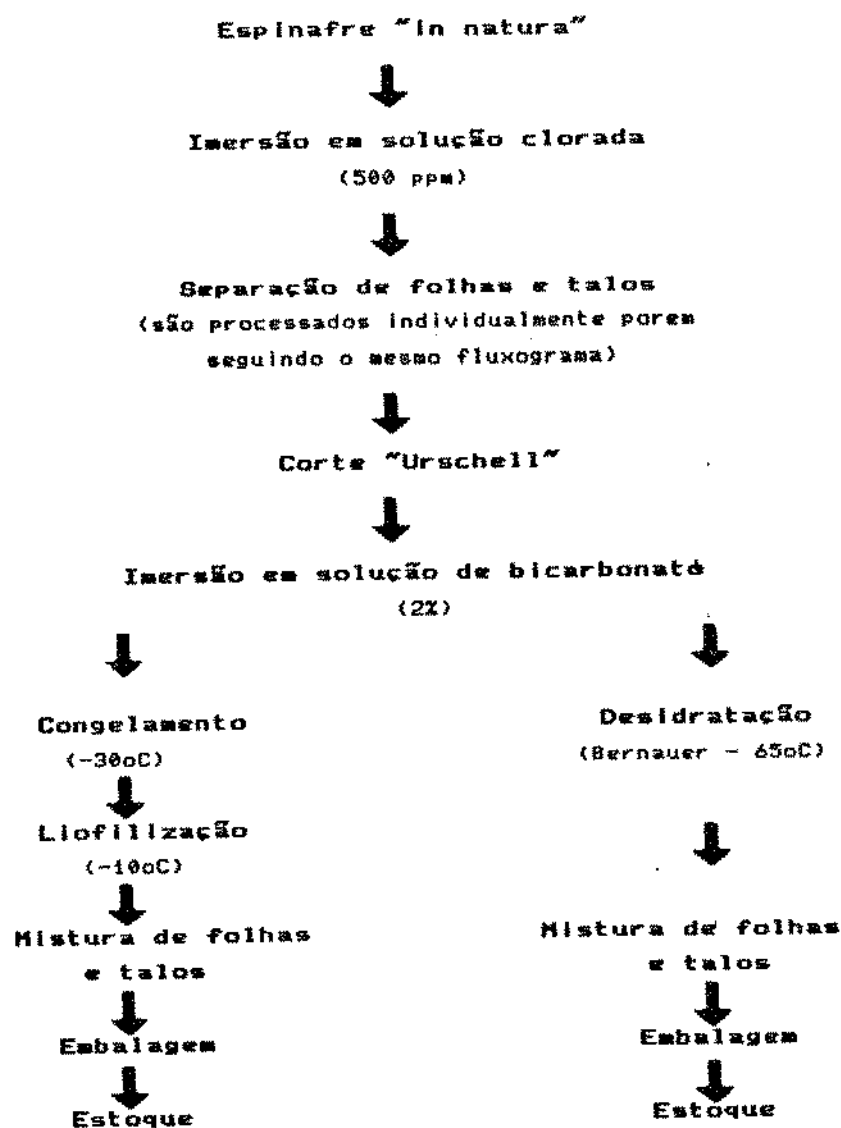


Figura 4 - Fluxograma de desidratação e liofilização do espinafre.

clorada e de bicarbonato de sódio. Segundo a indústria, esses parâmetros variam com as condições (segredo industrial) e a quantidade de matéria-prima.

3.3 - Análises Químicas

Tanto para as amostras frescas como para as processadas, foram utilizados os mesmos métodos de análises químicas.

3.3.1 - Sólidos totais

Foi utilizado o método gravimétrico para vegetais enlatados, ADAC 964.22. Foi realizado um teste para se ter certeza de que, após as condições estabelecidas, o peso se mantinha constante tanto para a matéria-prima como para os produtos desidratados.

3.3.2 - Sólidos Insolúveis

Foi utilizado o método gravimétrico para vegetais enlatados, ADAC 911.02. As condições de extração foram padronizadas. A temperatura da água de extração foi mantida em torno de 80-85°C. O tempo de extração foi de um minuto, com agitação manual. A centrifugação (centrífuga FANEM, modelo 204-NR) foi realizada a 3200 rpm, por três minutos.

3.3.3 - Sólidos Solúveis

Calculados por diferença de sólidos totais e sólidos insolúveis de acordo com ADAC 940.31.

3.3.4 - Determinação de Carotenóides

Todas as operações, começando com a extração, foram realizadas com as luzes apagadas, tomando-se o cuidado de proteger os pigmentos da incidência de luz difusa com auxílio de papel alumínio. O método para extração de carotenóides foi baseado no procedimento descrito por Rodriguez et al., (1976), com algumas modificações de acordo com a natureza das amostras.

3.3.4.1 - Extração

A extração foi realizada, triturando-se as amostras em um liquidificador, com acetona resfriada, seguida por filtração em funil de Buchner, a vácuo. Esta operação foi repetida até que o resíduo se tornasse incolor. A seguir, os pigmentos, dissolvidos em acetona, foram transferidos, em pequenas porções, para éter de petróleo em funil de separação, sendo cada adição seguida por lavagem com água destilada para retirada da acetona.

Para uma extração mais eficiente, foram introduzidas duas modificações: (1) antes da trituração, a amostra fresca foi deixada em acetona, por 30 minutos, na geladeira, para aumentar a penetração do solvente; (2) as amostras desidratadas e liofilizadas foram umedecidas com água, até que a capacidade de absorção do tecido vegetal fosse aparentemente esgotada. Após isso, a amostra foi deixada em acetona, como para a amostra fresca.

Após a extração, foi determinado o conteúdo de carotenóides totais do extrato em éter de petróleo, utilizando-se um espectrofotômetro UNICAM, feixe duplo, modelo SP 8000.

3.3.4.2 - Concentração

O extrato de éter de petróleo, contendo os carotenóides, foi então concentrado a um mínimo volume possível, em roto-evaporador (roto-evaporador BUCHLER INSTRUMENTS, modelo "Flash Evaporator").

As amostras em estudo não necessitaram de saponificação.

3.3.4.3 - Separação

A separação dos carotenóides foi feita através de cromatografia em coluna. A coluna utilizada era de vidro, com 2,0 cm de diâmetro e empacotada com Hyflosupercel;MgO (Reagen) (2:1) até uma altura de 10 cm. No topo da coluna foi colocada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro para reter a água que pudesse ainda estar presente na amostra. Após aplicação da amostra no topo, a coluna foi desenvolvida por uma concentração crescente de éter etílico e acetona em éter de petróleo, utilizando-se vácuo, fornecido por teompa d'água. Os pigmentos, em frações, contendo acetona, foram lavados com água, para retirada do solvente. As frações foram concentradas ou diluídas a volumes conhecidos.

Para a separação dos carotenóides cis de α - e β -caroteno, empregaram-se colunas de vidro de 1 cm de diâmetro, empacotadas com Ca(OH)_2 a uma altura de 10 cm, também com utilização de vácuo.

As frações que continham misturas de 2 ou mais carotenóides, foram recromatografadas em coluna de alumina, empacotada a 10 cm de altura, em colunas de vidro de 1 cm de diâmetro.

O esquema de separação dos carotenóides encontra-se nas figuras 5 e 6, para cenoura e espinafre, respectivamente.

3.3.4.4 - Identificação

Os carotenóides foram identificados através dos seguintes parâmetros: (1) ordem de eluição das frações na coluna; (2) espectros de absorção no visível; (3) valores de RF na camada delgada de sílica gel; (4) reações químicas específicas;

Os carotenóides isolados, após concentrados, foram submetidos à cromatografia em camada delgada de sílica gel (previamente ativada a 110 °C, por duas horas), utilizando 3% de metanol em benzeno como fase móvel. Nestas condições, os carotenos eluem junto com a frente do solvente, enquanto os oxicarotenóides são retidos em maior ou menor grau, dependendo dos grupos funcionais existentes.

A identificação e a posição dos substituintes foram confirmadas através de reações químicas.

Para se verificar a existência de epóxidos, a placa de sílica, após desenvolvimento, foi exposta a vapores de HCl. A presença de epóxidos evidencia-se pela mudança de coloração das manchas, de amarelo ou laranja, para azul ou verde (Gross *et al.*, 1971). A presença de um ou mais grupos 5,6 epóxidos, é detectada pela diminuição no comprimento de onda de 20 a 40 nm, respectivamente, após adição de HCl 0,1 N à solução etanólica do pigmento, devido à transformação do 5,6 epóxido em 5,8 epóxido.

Para verificar a forma cis ou trans, é realizada a fotoisomerização com iodo como catalizador, adicionando-se algumas

FASE ESTACIONÁRIA:

Mg - HYFLOSUPERCEL (1:2)

Ca(OH)₂

ALUMINA

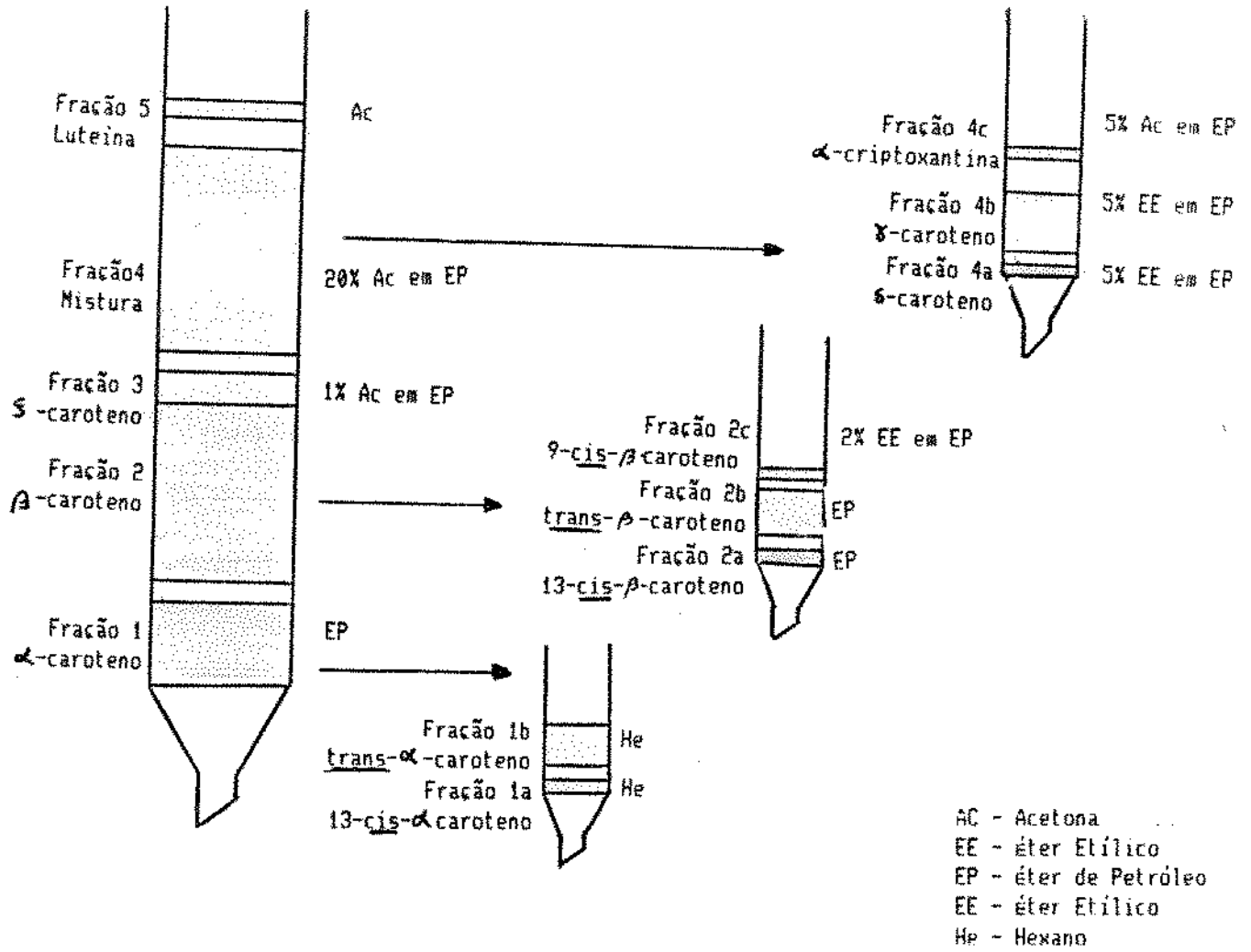


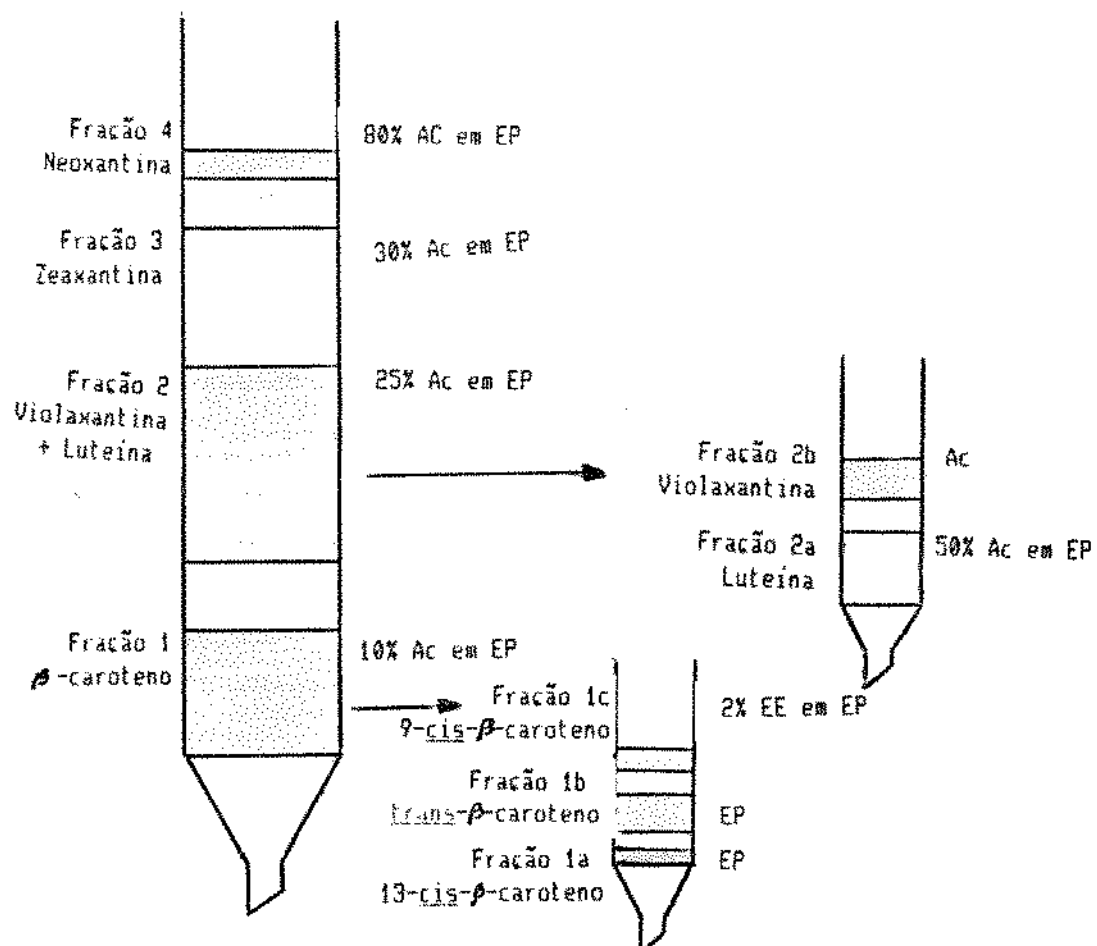
Figura 5 - Esquema de separação de carotenóides da cenoura, variedade "Nantes"

FASE ESTACIONÁRIA:

Mg - HYFLOSUPERCEL (1:2)

Ca(OH)₂

ALUMINA



AC - Acetona
 EE - éter Etílico
 EP - éter de Petróleo
 He - Hexano

Figura 6 - Esquema de separação de carotenóides do espinafre, variedade "Nova Zelândia"

gotas de solução etérea de iodo ao pigmento em éter de petróleo. O espectro registrado, após 5 minutos de exposição à luz, no caso de carotenóides originalmente trans, demonstra um deslocamento para comprimentos de onda mais baixos, devido à isomerização para a forma cis. O contrário ocorreu com o cis-carotenóide, sendo que, em alguns casos, não houve deslocamento (Davies, 1976).

A presença de hidroxila alílica, em posição isolada ou conjugada, é confirmada por metilação. Efetua-se uma reação por adição de algumas gotas de HCl 2N ao pigmento dissolvido em metanol. Após repouso de 3 horas, no escuro e à temperatura ambiente, a fração é novamente transferida para éter de petróleo e recromatografada em camada delgada. Reação positiva caracteriza-se por um aumento no valor de RF.

3.3.4.5 - Quantificação

A quantificação de cada pigmento foi feita, a partir da absorbância máxima, usando-se a lei de Beer. Os coeficientes de absorção foram obtidos da tabela apresentada por Davies (1976) e Sweeney e Marsh (1970). Para carotenóides totais, foi usado o valor de absorvidade do β -caroteno.

Os resultados finais foram expressos em microgramas de carotenóides por grama de amostra.

3.3.4.6 - Cálculo do valor de vitamina A

O valor de vitamina A foi calculado a partir da atividade provitamínica de cada carotenóide, tabelada por Bauernfeind (1972), e dos fatores de conversão dados pelo NAS-NRC (1980).

Para o cálculo do valor de vitamina A dos isômeros de α - e β -caroteno, foram utilizadas as biopotências obtidas por Zechmeister, (1949).

3.3.4.7 - Análise estatística

Foi realizada análise de variância de um ("one-way") e dois fatores ("two-way"), com interação, e blocos casualizados, com auxílio do software MICROSTAT. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Composição Qualitativa de Carotenóides da Cenoura, Variedade "Nantes"

A composição de carotenóides da cenoura varia em função de muitos fatores, tais como variedade ou cultivar e estágio de maturação, conforme já discutido. Na variedade analisada foram encontrados 7 carotenóides (cinco carotenos, um monohidroxilado e um dihidroxilado). As características desses carotenóides apresentam-se resumidas na tabela 7 e suas respectivas estruturas na figura 7.

As cinco primeiras frações foram identificadas como carotenos, baseadas na ordem de eluição na coluna (Figura 5) e da ausência de grupos substituintes, confirmada na camada delgada de sílica gel desenvolvida por 3% de metanol em benzeno, onde eluíram com a frente do solvente (ver RF da Tabela 7). Feito isso, cada caroteno foi identificado individualmente com base em seu espectro de absorção visível característico.

As frações 1 e 2 foram identificadas como α - e β -caroteno, respectivamente. Para verificação da existência ou não de suas formas isoméricas, essas frações foram, cada uma, recromatografadas em $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Para a fração 1, obtiveram-se 2 frações, 1a e 1b, que foram identificadas, respectivamente, como 13-cis- α -ca-

Tabela 7 - Características dos carotenóides encontrados em cenoura, variedade "Nantes"

Fração	Identificação	Máximos de absorção(nm) (éter de petróleo)	RF na camada delgada	Reações químicas
1a	13-cis- β -caroteno	465, 438, 416	0,99	trans (-); vapores de HCl (-);
1b	trans- α -caroteno	472, 443, 422	0,99	trans (+); vapores de HCl (-);
2a	13-cis- β -caroteno	472, 445, (420)	0,99	trans (-); vapores de HCl (-);
2b	trans- β -caroteno	475, 448, (422)	0,99	trans (+); vapores de HCl (-);
2c	9-cis- β -caroteno	473, 445, (422)	0,99	trans (-); vapores de HCl (-);
3	ζ -caroteno	422, 398, 377	0,99	- ; vapores de HCl (-);
4a	δ -caroteno	432, 454, 478	0,99	- ; vapores de HCl (-);
4b	γ -caroteno	490, 466, 436	0,99	- ; vapores de HCl (-);
4c	α -criptoxantina	472, 443, 422	0,40	- ; vapores de HCl (-); metilação (+);
5	luteína	472, 443, 422	0,13	- ; vapores de HCl (-); metilação (+);

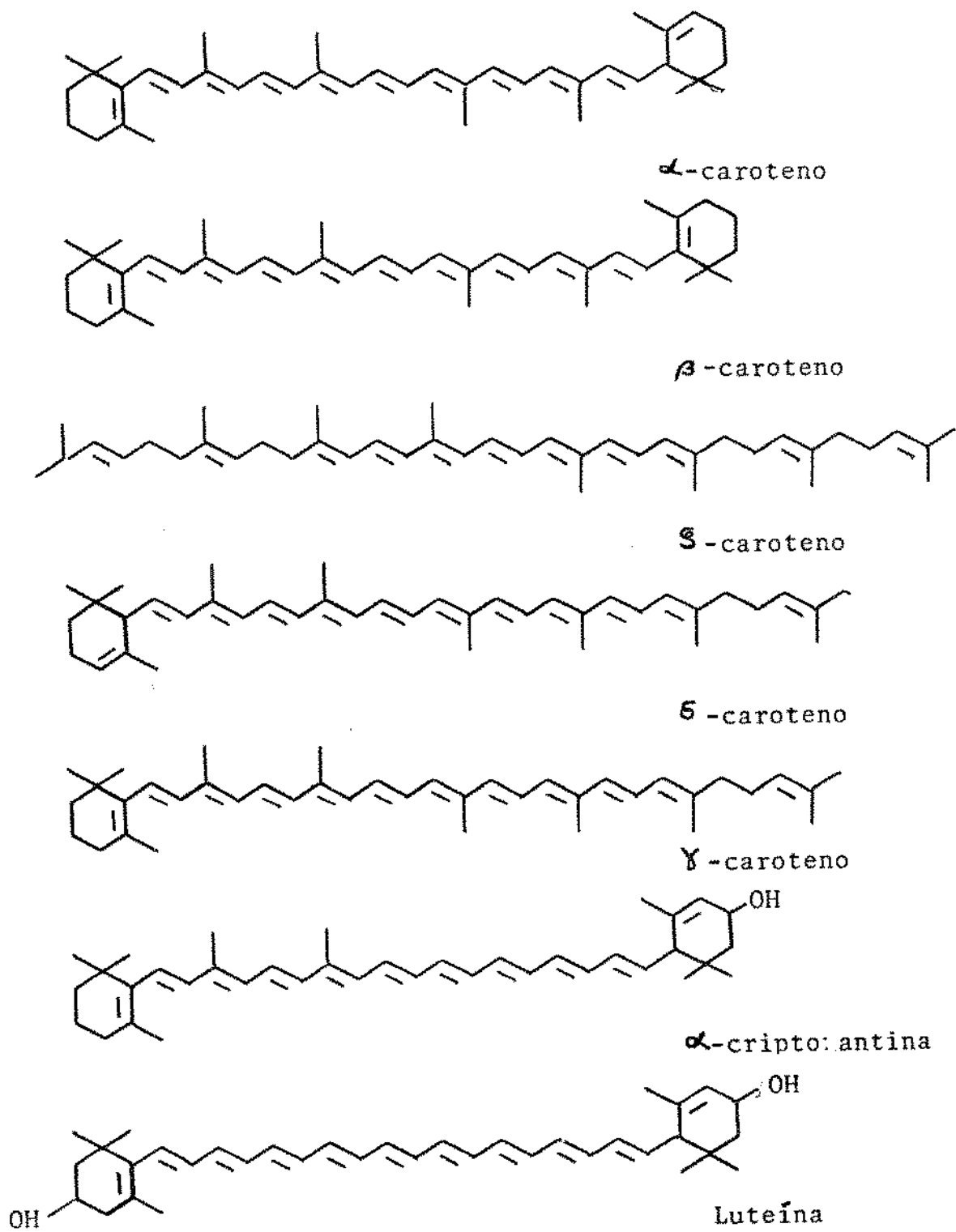


Figura 7 - Estruturas de carotenóides encontradas na cenoura, variedade "Nantes"

roteno e trans- α -caroteno. A fração 2 desmembrou-se em outras 3 frações, 2a, 2b e 2c, que corresponderam ao 13-cis- β -caroteno, trans- β -caroteno e 9-cis- β -caroteno (Figura 5). A confirmação das formas isoméricas foi realizada pela reação de isomerização catalisada por iodo. As Figuras 8 e 9 representam os espectros de absorção característicos desses carotenos.

O terceiro caroteno foi identificado como ζ -caroteno, o quarto como δ -caroteno e o quinto como γ -caroteno. Seus espectros de absorção estão apresentados na Figura 10.

Nos trabalhos sobre composição de carotenóides de cenoura, encontrados na literatura, somente o de Strain (1939), relata a presença de δ -caroteno.

O sexto carotenóide tem espectro de absorção característico do cromóforo do α -caroteno (Figura 8). Sua posição na camada delgada, RF 0,40, indica a presença de um grupo hidroxila. A posição alílica desse grupo foi confirmada pela resposta positiva à reação de metilação. Baseado nesses parâmetros, o carotenóide foi identificado como α -criptoxantina. Vários autores (Harper e Zscheile, 1945; Umiel e Gabelman, 1971 e 1972; Baloch *et al.*, 1977 a.c; Buishand e Gabelman, 1979; Ogunlesi e Lee, 1979; Edwards e Lee, 1986; Lee, 1986; Simon e Wolff, 1987), relatam a presença de um carotenóide monohidroxilado, porém a identificação e a confirmação desse carotenóide não foram realizadas.

O sétimo e último carotenóide foi identificado como luteína. Seu espectro de absorção também é típico da estrutura do α -caroteno (Figura 8). Sua posição na camada delgada, RF 0,13, indica a presença de duas hidroxilas. A reação positiva à metila-

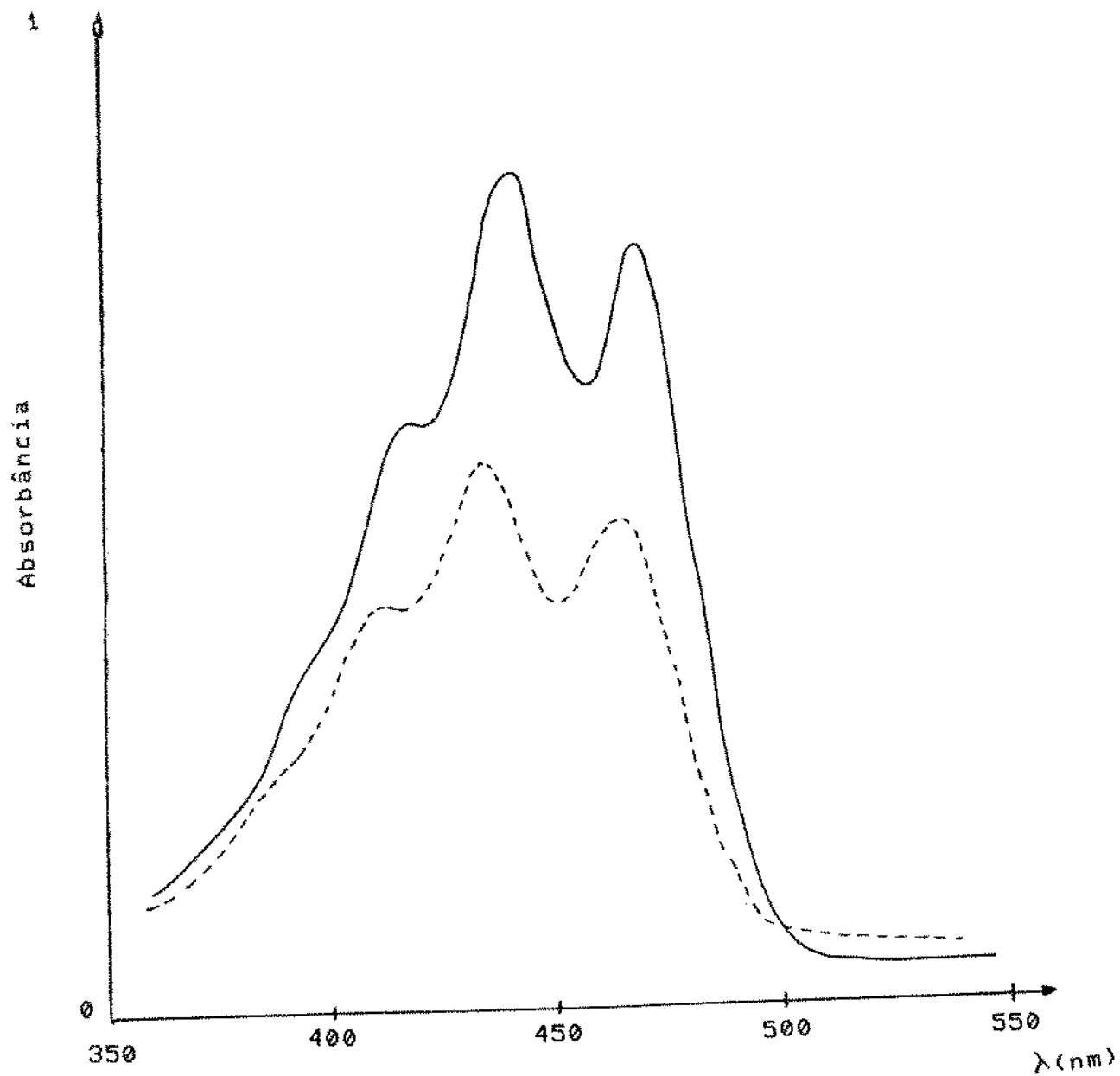


Figura 8 - Espectros de absorção, em éter de petróleo, de trans- α -caroteno, α -criptoxantina, luteína (—) e 13-cis- α -caroteno (---)

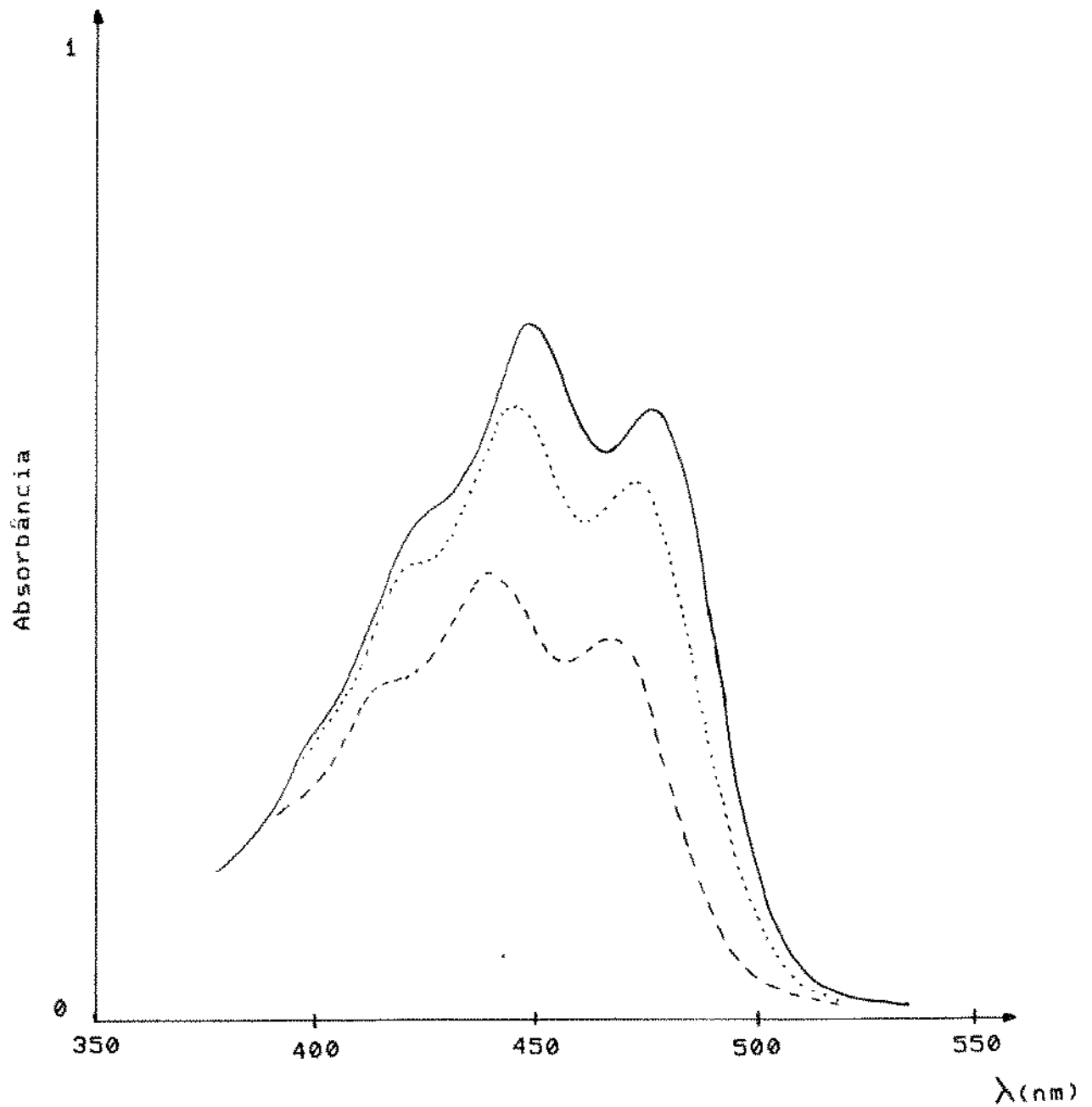


Figura 9 - Espectros de absorção, em éter de petróleo, de trans- β -caroteno, zeaxantina (—), 9-cis- β -caroteno (---) e 13-cis- β -caroteno (...)

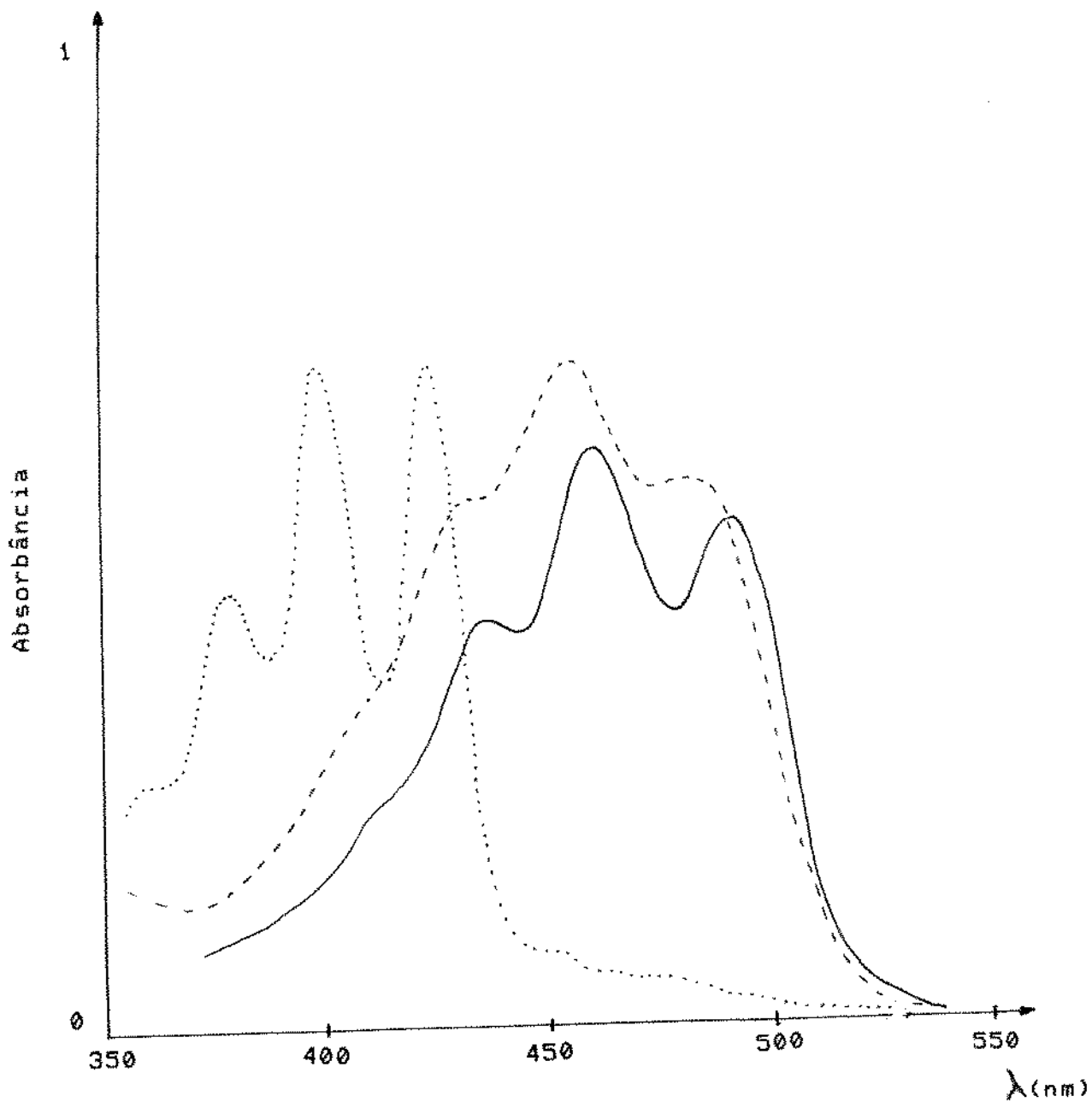


Figura 10 - Espectros de absorção, em éter de petróleo, de α -caroteno (—), β -caroteno (---) e γ -caroteno (- -).

ção, elevando o RF para 0,40, demonstrou a posição alílica de uma das hidroxilas.

4.2 - Composição Qualitativa de Carotenóides de Espinafre Variedade "Nova Zelândia"

O espinafre da variedade "Nova Zelândia" apresentou a composição de carotenóides esperada em hortaliças folhosas: β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina e neoxantina (Ramos e Rodriguez-Amaya, 1987; Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1990). Não foi detectada α -criptoxantina. A Tabela 8 resume as características dos carotenóides encontrados, e a Figura 11, as respectivas estruturas.

O β -caroteno, seus isômeros e a luteína foram identificados como descrito para a cenoura.

A fração 2 é uma mistura de dois carotenóides, que foram quantificados juntos. A separação das bandas amarelo-laranja em coluna de alumina (Figura 6), possibilitou a identificação dos dois carotenóides como luteína e violaxantina. A violaxantina foi identificada através de seu RF pouco menor que o da luteína, indicando ser também um carotenóide dihidroxilado, com outro grupo substituinte. Quando a camada delgada foi submetida a vapores de HCl, a mancha amarela tornou-se azul, indicando ser um epóxi carotenóide. A reação de acetilação positiva confirmou a presença de hidroxilas. Com adição de HCl 0,1 N ao pigmento em solução etanólica, um deslocamento hipsocrômico de 40 nm foi ob-

Tabela 8 - Características dos carotenóides encontrados em Espinafre variedade, "Nova Zelândia"

Fração	Identificação	Máximos de absorção(nm) (éter de petróleo)	RF na camada delgada	Reações químicas
1a	13-cis- β -caroteno	472,445,(424)	0,99	trans (-); vapores de HCl (-);
1b	trans- β -caroteno	474,449,(425)	0,99	trans (+); vapores de HCl (-);
1c	9-cis- β -caroteno	473,446,(422)	0,99	trans (-); vapores de HCl (-);
2a	luteína	472,445,422	0,15	- ; vapores de HCl (-); metilação (+);
2b	violaxantina	469,440,417	0,13	- ; vapores de HCl (+);
3	neoxantina	464,436,412	0,03	- ; vapores de HCl (+); metilação (-); acetilação (+);
4	zeaxantina	461,444,421	0,14	- ; vapores de HCl (-); metilação (-); acetilação (+);

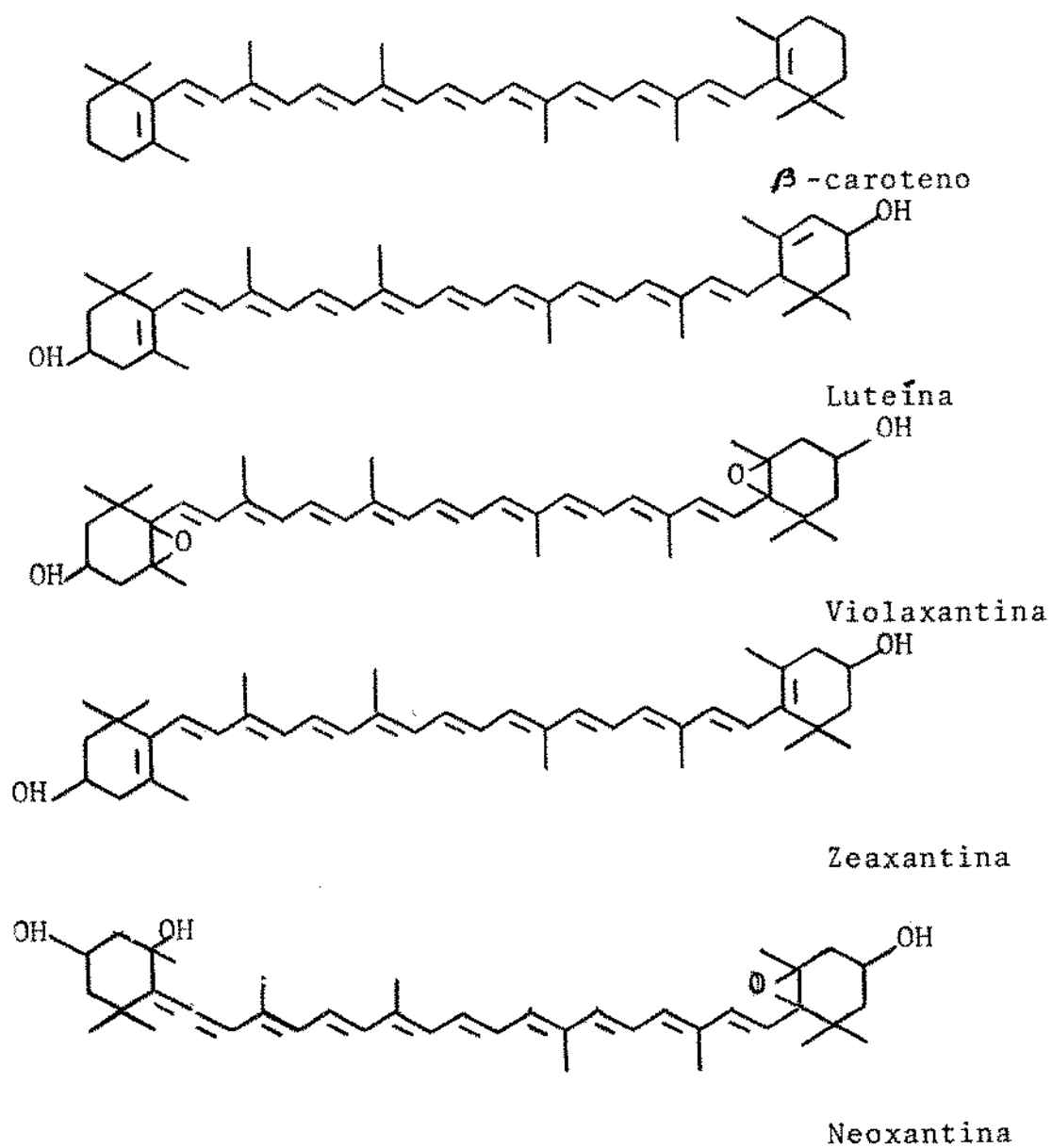


Figura 11 - Estruturas de carotenóides encontrados no espinafre, variedade "Nova Zelândia"

servado, indicando a presença de dois grupos 5,6-epóxidos (Figura 12).

As frações 3 e 4 foram identificadas como neoxantina e zeaxantina, respectivamente. A ordem de eluição na coluna foi o inverso de esperado. A neoxantina possui três grupos hidroxilados e deveria sair da coluna após a zeaxantina, que possui apenas duas hidroxilas.

A neoxantina foi identificada pelos valores de máximos de absorção e, principalmente, pelo fato de, praticamente, não se mover da origem na camada delgada, indicando a presença de três grupos hidroxilas, confirmados por acetilação positiva. A presença de grupo epóxi foi detectada pela mudança de coloração, da mancha da placa, para azul. A adição de HCl 0,1 N causou um deslocamento hipsocrômico de 20 nm, indicando a presença de um grupo 5,6-epóxido. A metilação foi negativa. A Figura 13 apresenta seu espectro de absorção antes e após a adição do HCl.

A fração identificada como zeaxantina possuía espectro de absorção característico de β -caroteno (Figura 9) e RF (0,14), comum aos carotenóides dihidroxilados. As respostas, positiva para acetilação e negativa para metilação, confirmaram a presença de grupos hidroxilados em posição não alílica.

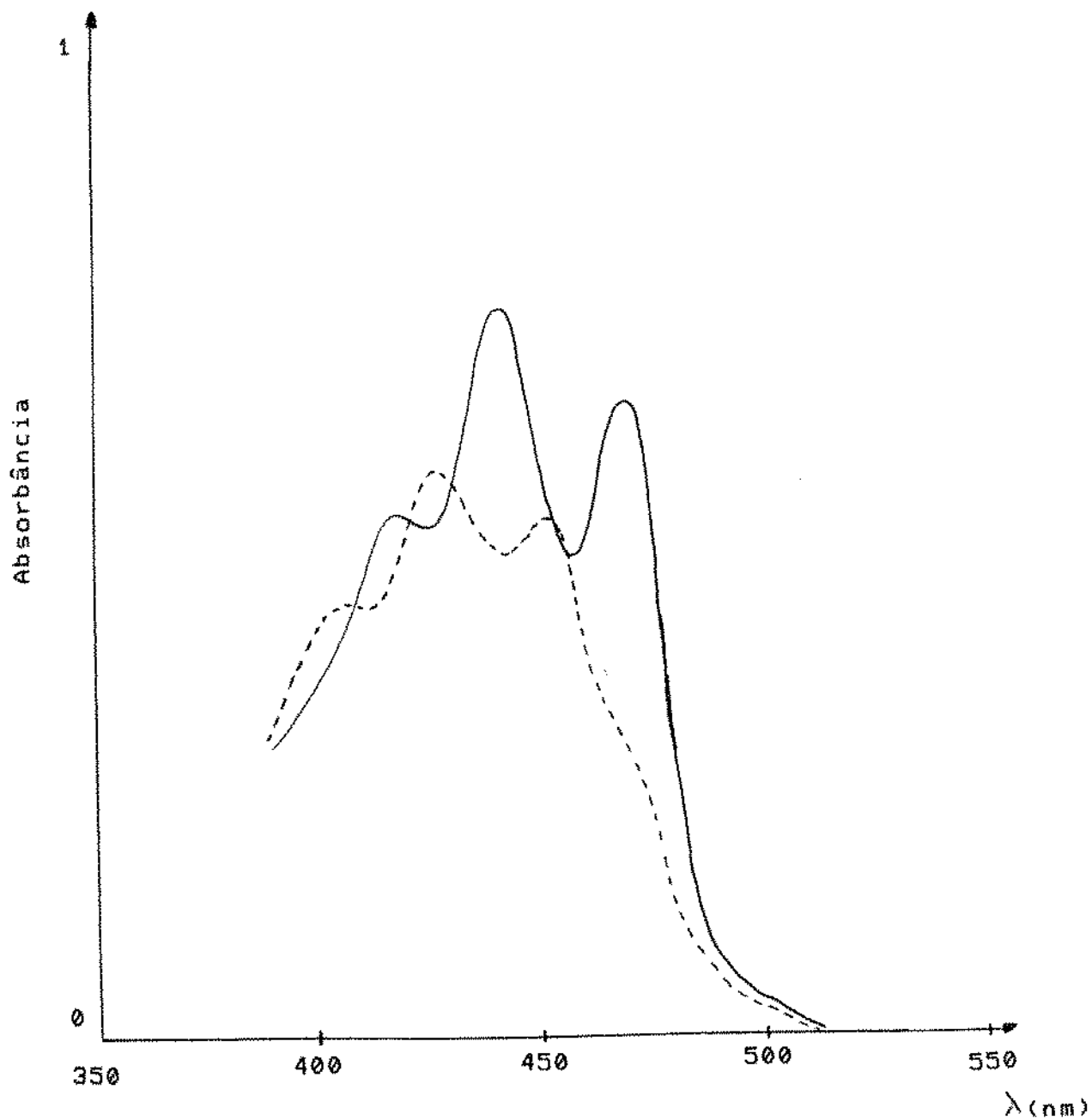


Figura 12 - Espectros de absorção, em etanol, de violaxantina, antes (—) e após (---) a adição de HCl

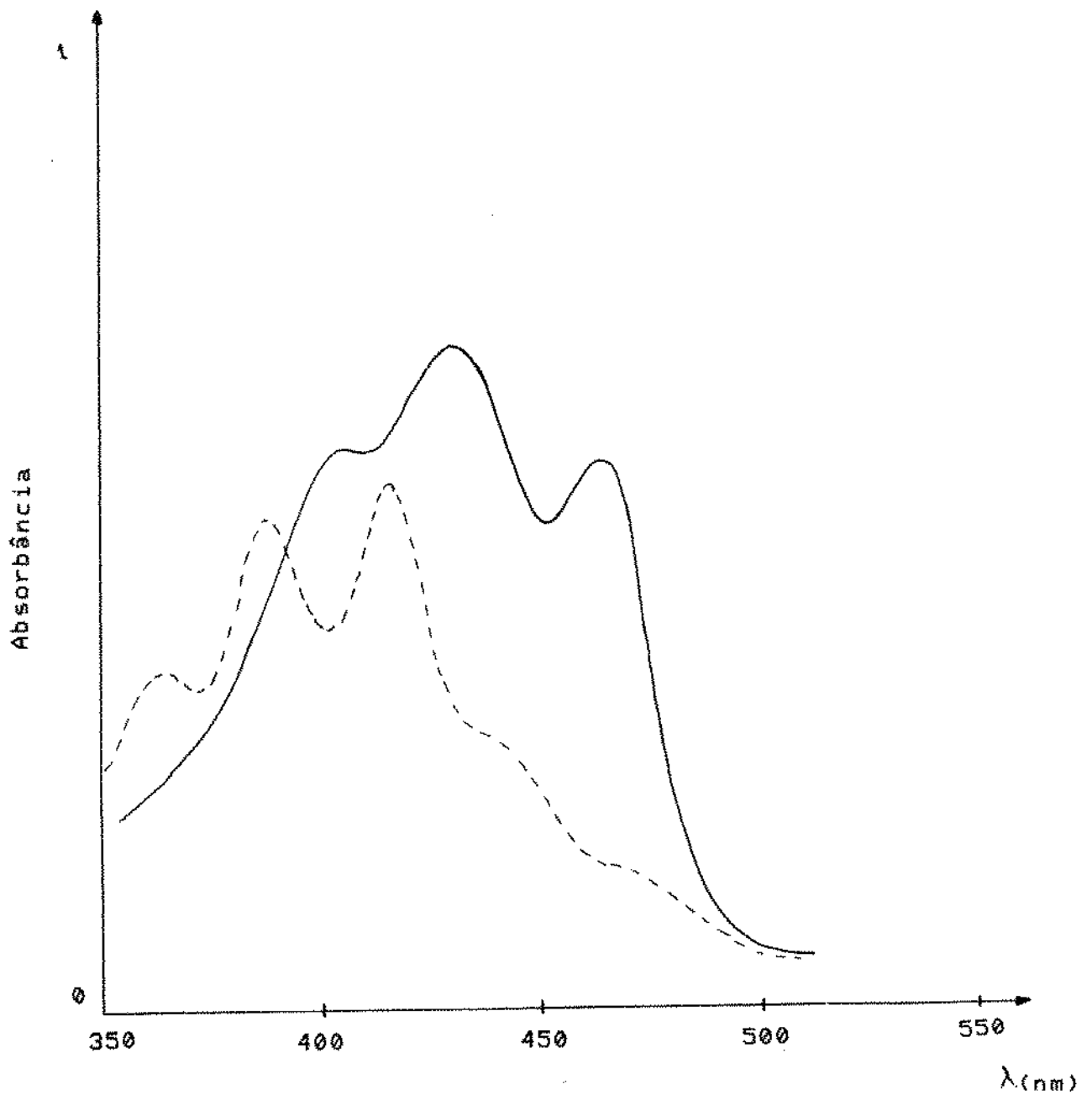


Figura 13 - Espectros de absorção, em etanol, de neoxantina, antes (—) e após (---) a adição de HCl

4.3 - Perdas Durante a Desidratação e a Liofilização da Cenoura

Resultados não coerentes na literatura em relação à retenção de carotenóides, durante o processamento e a estocagem de alimentos, demonstram a dificuldade de se avaliar essa retenção. Com o mesmo alimento e o mesmo tipo de processamento, relatos, tanto de aumentos como de perdas consideráveis de carotenóides, foram publicados. Um certo cuidado na interpretação desses dados deve ser tomado, uma vez que os aumentos ou perdas podem refletir, não mudanças reais, mas fatores analíticos (Rodriguez-Amaya, 1991). Por exemplo, a eficiência da extração do produto processado pode ser maior (produtos enlatados) ou menor (produtos desidratados) que o da matéria prima, superestimando ou subestimando os teores de carotenóides. Falsos aumentos também podem ser reportados, quando o cálculo não leva em conta a perda de peso devido a lixiviação de sólidos solúveis. Por outro lado, perdas de carotenóides ocorridas durante a análise podem ser atribuídas ao processamento ou estocagem.

No preparo doméstico ou no processamento de lotes pequenos, o cálculo da retenção ou da perda pode ser feito com base no peso fresco da matéria prima, evitando-se assim problemas com a lixiviação. Isso, obviamente, não pode ser feito com o processamento em escala industrial. Consequentemente, existem dificuldades no cálculo, além da amostragem.

Lotes grandes, como os industriais, dificultam a amostragem, devido à grande variação das características inerentes à

própria amostra dentro do próprio lote e entre lotes distintos. Somadas a isso, as condições de processamento podem variar, levando a produtos finais com características diferentes.

Tudo isso torna necessário que sejam realizadas várias replicatas de cada amostra e que vários ensaios sejam realizados, para que se tenha uma idéia real das perdas.

Porém, em se tratando de carotenóides, isso nem sempre é viável. A análise é longa e necessita ser realizada no menor tempo possível para evitar falsos resultados, devidos à degradação durante a análise. Além disso, a homogeneização de grandes quantidades de amostra com a retirada de uma porção representativa, e na quantidade adequada para análise, nem sempre é possível.

Por esses motivos, as perdas em escala industrial são raramente avaliadas, embora reflitam a situação real.

4.3.1 - Repetibilidade do método

Inicialmente, um estudo de repetibilidade do método foi realizado. Foram analisados α -, β - e ξ -caroteno e carotenóides totais de cinco replicatas. A Tabela 9 apresenta esses resultados em base úmida, seca e de sólidos insolúveis. Foi observado que coeficiente de variação (C.V.) variou de 5% para o β -caroteno a 11% para o ξ -caroteno. A análise de variância indicou que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as replicatas.

Tabela 9 - Concentração dos principais carotenóides de cenoura, variedade "Nantes"

Carotenóides	Concentração (ug/g)					N ± DP	CV (X)
	1	2	3	4	5		
BASE ÚNIDA							
α-caroteno	22a	26a	22a	24a	21a	23 ± 2	9
β-caroteno	38a	43a	39a	39a	36a	40 ± 2	5
γ-caroteno	3a	4a	4a	4a	4a	4 ± 0	11
Carotenóides Totais	69a	82a	79a	81a	78a	78 ± 5	7
BASE SECA							
α-caroteno	284a	328a	281a	313a	266a	294 ± 25	9
β-caroteno	489a	551a	545a	502a	488a	507 ± 27	5
γ-caroteno	43a	54a	57a	46a	50a	50 ± 6	11
Carotenóides Totais	894a	1058a	1018a	1044a	1006a	1003 ± 67	7
BASE SÓLIDOS INSOLÚVEIS							
α-caroteno	900a	1041a	890a	993a	844a	933 ± 81	9
β-caroteno	1553a	1749a	1602a	1593a	1549a	1645 ± 82	5
γ-caroteno	137a	171a	179a	146a	160a	159 ± 18	11
Carotenóides Totais	2623a	3358a	3220a	3313a	3190a	3182 ± 212	7

N - Média; DP - Desvio-Padrão; CV - Coeficiente de Variação;

A mesma letra, na mesma linha, indica que os valores não diferiram significativamente (P < 0,05)

4.3.2 - Variação dos sólidos totais, sólidos solúveis e sólidos insolúveis durante o processamento

Os valores de sólidos totais, sólidos insolúveis e sólidos solúveis de três ensaios diferentes de cenoura desidratada e liofilizada se encontram na Tabela 10.

Como já visto no fluxograma de processamento (Figura 3), a cenoura sofreu dois tipos de branqueamento: imersão em água fervente e passagem por túnel de vapor. Porém, observando os dados do primeiro, segundo e terceiro ensaios, a lixiviação devido aos branqueamentos foram 9, 3 e 6 %, respectivamente.

Alguns autores (Lee, 1945; Weckel *et al.*, 1962; Della-Monica e MacDowell, 1965; Baloch *et al.*, 1977a), atribuíram aumentos aparentes de carotenóides à perda de sólidos solúveis (lixiviação) durante algumas etapas do processamento, notadamente no branqueamento. Porém, somente Baloch determinou o teor de sólidos solúveis, encontrando uma perda de 2,7% por branqueamento a vapor. Em um estudo não relacionado com carotenóides, Gooding (1960) mostrou que, dependendo do corte e do tamanho dos pedaços de cenoura, a perda de sólidos solúveis pode ser maior que 30%, se escaldados por três minutos e meio. A lixiviação por branqueamento a vapor pode atingir cerca de 8%.

4.3.3 - Perda de carotenóides durante a desidratação e a liofilização (base seca)

A grande maioria dos trabalhos sobre o efeito de processamento na composição de carotenóides é realizada em base se-

Tabela 10 - Variação de sólidos insolúveis, sólidos solúveis e sólidos totais durante a desidratação e a liofilização da cenoura.

	Sol. Insolúveis (XST)	Sol. Solúveis (XST)	Sol. Totais (X)	Perdas de sól.sol. em relação à amostra fresca(X)
Ensaio 1				
Fresca	28	72	10	-
Branqueada	37	63	7	9
Desidratada	37	63	97	9
Liofilizada	37	63	97	9
Ensaio 2				
Fresca	31	69	9	-
Branqueada	34	66	8	3
Desidratada	34	66	94	3
Liofilizada	34	66	98	3
Ensaio 3				
Fresca	32	68	8	-
Branqueada	38	62	6	6
Desidratada	38	62	93	6
Liofilizada	38	62	98	6

X ST - Porcentagem de sólidos totais

ca. Utilizando este tipo de cálculo (Tabela 11), podemos ver que houve aumentos aparentes consideráveis nos dois primeiros ensaios

4.3.4 - Perda de carotenóides durante o processamento (base de sólidos insolúveis)

4.3.4.1 - Perdas por branqueamento

A Tabela 12 reúne as mudanças ocorridas no branqueamento, em dois ensaios, de α -, β - e ξ -carotenos e de carotenóides totais.

No ensaio 1, α -caroteno e carotenóides totais não se alteraram significativamente ($P < 0,05$). No entanto, β -caroteno e ξ -caroteno tiveram perdas significativas ($P < 0,01$) de 16% e 51%, respectivamente.

No ensaio 2, não houve mudanças significativas ($P < 0,05$) nos teores desses carotenóides. Esses resultados indicam que houve diferenças nas condições dos branqueamentos, sendo mais drásticas as do ensaio 1.

4.3.4.2 - Perdas de carotenóides por desidratação e liofilização

Os resultados demonstraram que, para α -caroteno, a desidratação não causa perdas significativas ($P < 0,05$), em nenhum dos três ensaios (Tabela 13).

Para o β -caroteno, não foram observadas mudanças significativas ($P < 0,05$) nas desidratações do segundo e terceiro ensaios. No primeiro ensaio, houve uma diminuição significativa

Tabela 11 - Mudanças nos conteúdos de carotenóides durante o processamento da cenoura (base seca)

Carotenóide	Concentração ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	Fresca	Desidratada	Liofilizada
Ensaio 1			
α -caroteno	231 \pm 6	269 \pm 26	258 \pm 70
β -caroteno	485 \pm 7	542 \pm 21	878 \pm 38
ξ -caroteno	56 \pm 5	8 \pm 0	93 \pm 7
Carot. totais	838 \pm 35	1120 \pm 99	1446 \pm 259
Ensaio 2			
α -caroteno	198 \pm 20	263 \pm 19	297 \pm 8
β -caroteno	465 \pm 7	517 \pm 3	624 \pm 18
ξ -caroteno	58 \pm 17	104 \pm 2	101 \pm 12
Carot. totais	815 \pm 30	919 \pm 47	1003 \pm 11
Ensaio 3			
α -caroteno	323 \pm 7	394 \pm 5	306 \pm 1
β -caroteno	531 \pm 26	699 \pm 9	571 \pm 19
ξ -caroteno	50 \pm 5	125 \pm 0	90 \pm 9
Carot. totais	1059 \pm 67	1106 \pm 199	1079 \pm 8

¹ - Médias e desvios-padrões da análise, em duplicatas

Tabela 12 - Mudanças nos conteúdos dos principais carotenóides da cenoura durante o branqueamento (base sólidos insolúveis)

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$) ¹		Perdas (%)
	Amostra fresca	Amostra branqueada	
Ensaio 1			
α -caroteno	828a \pm 23	799a \pm 157	4
β -caroteno	1736a \pm 25	1458b \pm 3	16
γ -caroteno	198a \pm 20	98b \pm 11	51
Carotenóides Totais	2980a \pm 123	2789a \pm 417	6
Ensaio 2			
α -caroteno	641a \pm 64	774a \pm 86	-
β -caroteno	1533a \pm 24	1515a \pm 0	1
γ -caroteno	190a \pm 57	199a \pm 10	5
Carotenóides Totais	2640a \pm 96	2856a \pm 63	8

¹ - médias e desvios-padrão da análise, em duplicatas

A mesma letra na mesma linha indica que os valores não diferiram significativamente ($P < 0,05$)

Tabela 13 - Mudanças no conteúdo carotenóides durante o processamento de cenoura (base de sólidos insolúveis)

	Concentração ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	Fresca	Desidratada	Liofilizada
ensaio 1			
α -caroteno	823a \pm 23	740a \pm 54	700a \pm 116
β -caroteno	1725a \pm 25	1494b \pm 47	2383c \pm 62
ξ -caroteno	198a \pm 20	21b \pm 0	252a \pm 12
Carot. totais	2980a \pm 12	3079a \pm 221	3927a \pm 426
ensaio 2			
α -caroteno	644a \pm 64	769a \pm 49	870a \pm 15
β -caroteno	1515a \pm 24	1470a \pm 42	1828b \pm 35
ξ -caroteno	188a \pm 57	304b \pm 7	297b \pm 24
Carot. totais	2655a \pm 96	2690a \pm 120	3170a \pm 22
ensaio 3			
α -caroteno	1024a \pm 40	1037a \pm 12	806b \pm 4
β -caroteno	1683a \pm 2	1840a,b \pm 23	1501a,c \pm 52
ξ -caroteno	160a \pm 17	329b \pm 1	235a \pm 23
Carot. totais	3360a \pm 259	2910a,c \pm 486	2840b,c \pm 27

¹ - Médias e desvios-padrão da análise, em duplicatas

A mesma letra, na mesma linha, indica que os valores não diferiram significativamente ($P < 0,05$)

($P < 0,01$), de 13%.

O ξ -caroteno apresentou aumentos bastante significativos ($P < 0,01$) em seus teores, por desidratação, de 38 e 51%, respectivamente, para o segundo e terceiro ensaios. No primeiro ensaio, ao contrário, houve uma diminuição significativa ($P < 0,01$) de 89%.

Aumentos no conteúdo de ξ -caroteno, após o processamento térmico, embora não tão altos, já foram relatados (Padula e Rodriguez-Amaya, 1987). Uma vez que esse aumento não pode ser devido à formação química ou biossintética desse caroteno, é possível que, no processo de degradação um composto com número de ligações conjugadas (7) igual tenha sido formado e quantificado como ξ -caroteno. Isso mascara qualquer perda no ξ -caroteno.

Os resultados obtidos para β - e ξ -caroteno, na desidratação do ensaio 1, levam a crer que este ensaio foi o mais drástico. Observando-se os dados da Tabela 12, correspondentes às perdas ocorridas durante o branqueamento, podemos notar que essas perdas poderiam ser devidas principalmente à etapa do branqueamento.

A liofilização causou aumentos aparentes significativos ($P < 0,01$) no β -caroteno de 28 e 17%, respectivamente, para os ensaios 1 e 2. Uma vez que a perda de sólidos solúveis foi corrigida, esses resultados foram totalmente inesperados. Com isso, suspeitou-se que algum outro fator, poderia causar aumentos aparentes (como, por exemplo, a amostragem). Para verificar essa hipótese, no terceiro ensaio, maior quantidade e mais pontos foram amostrados, tanto para a amostra fresca como para as processadas.

O α -caroteno teve uma diminuição significativa ($P < 0,01$) de 21%, enquanto que β -caroteno e ξ -caroteno não se alteraram significativamente

Quanto ao conteúdo de carotenóides totais, não houve mudança significativa ($P < 0,05$) para o produto desidratado, mas houve diminuição significativa ($P < 0,01$) de 15%, por liofilização, no terceiro ensaio.

Comparando desidratação com liofilização, no terceiro ensaio, podemos ver que a liofilização resultou em valores significativamente ($P < 0,01$) menores, de 22, 18, 29 e 15%, respectivamente para α - , β - e ξ -carotenos e carotenóides totais.

Della-Monica e MacDowell (1965) encontraram perda bem maior para o β -caroteno por secagem convencional por ar quente (74%) e, maior ainda, para a liofilização (88%), mesmo em base seca. Já Park (1987), comparando liofilização e secagem em estufa a vácuo, constatou que o teor de carotenos diminuiu em 50%, para os dois ensaios. Neste trabalho, o autor concluiu que a desidratação, independentemente do processo, reduziu substancialmente os carotenos.

Este estudo confirma que a avaliação do processo industrial é extremamente difícil, devido principalmente, como já discutido, a problemas de amostragem em lotes grandes e a variação nas condições de processamento.

De qualquer forma, foi possível constatar que a desidratação e a liofilização, mesmo em escala industrial, não causaram ou resultaram apenas pequenas perdas de carotenóides. Essa observação foi também relatada para outros alimentos (Lempka e Prominski,

1967; Livingston et al., 1968; Popovskii et al., 1968; Nogueira et al., 1978).

4.3.4.3 - Perdas de provitamina A

As mudanças nos valores de vitamina A acompanham o mesmo perfil do β -caroteno, uma vez que este é o principal carotenóide com atividade provitamínica na cenoura (Tabela 14).

A desidratação não causou perdas significativas ($P < 0,05$) de valor de vitamina A no segundo e terceiro ensaios. A diminuição significativa ($P < 0,01$) observada no primeiro ensaio (13%) corresponde à perda do β -caroteno.

Na liofilização do terceiro ensaio, a perda significativa ($P < 0,01$) do valor de vitamina A foi de 16%. Em termos industriais, essa redução não é considerada expressiva. Além disso, a cenoura é altamente rica em provitamina A e, mesmo com essa perda, o produto processado ainda continua sendo uma boa fonte.

4.3.4.4 - Variação da composição isomérica de α - e β -caroteno

Considerando que os isômeros cis possuem biopotências menores que os isômeros trans, foi feita uma tentativa de separar e quantificar os isômeros cis e trans de α - e β -caroteno, para determinar com maior exatidão os valores de vitamina A.

Pelos resultados das Tabelas 15 e 16, além da amostragem e variação nos processamentos já discutidos anteriormente, as dificuldades da análise em si contribuem para tornar os resultados não aproveitáveis.

Tabela 14 - Mudanças no valor de vitamina A durante o processamento de cenoura (base de sólidos insolúveis)

	Valor de Vitamina A (RE/100g)			Perdas(%)
	α -caroteno	β -caroteno	Total	
Ensaio 1				
Fresca	6856	28752	35608a	-
Desidratada	6166	24902	31068b	13
Liofilizada	5835	39718	45553c	22
Ensaio 2				
Fresca	5369	25241	30610a	-
Desidratada	6408	24502	30909a	1
Liofilizada	7244	30463	37706b	19
Ensaio 3				
Fresca	8535	28049	37677a	-
Desidratada	8642	30663	39305a	4
Liofilizada	6715	25024	31739b	16

A mesma letra, na mesma coluna, indica que os valores não diferiram significativamente ($P < 0,05$)

Tabela 15 - Variação na composição de isômeros de α -caroteno durante o processamento de cenoura (base de sólidos insolúveis)

	Conteúdo de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	Fresca	M \pm DP (CV) Desidratada	Liofilizada
Ensaio 1			
13- <u>cis</u> - α -caroteno	-	24 \pm 15 (63%)	145 \pm 198 (137%)
<u>trans</u> - α -caroteno	823 \pm 23 (3%)	62 \pm 194 (313%)	611 \pm 132 (22%)
Ensaio 2			
13- <u>cis</u> - α -caroteno	-	79 \pm 14 (18%)	11 \pm 0 (0%)
<u>trans</u> - α -caroteno	644 \pm 64 (10%)	633 \pm 23 (4%)	915 \pm 16 (2%)
Ensaio 3			
13- <u>cis</u> - α -caroteno	-	63 \pm 23 (37%)	28 \pm 0 (0%)
<u>trans</u> - α -caroteno	1024 \pm 40 (4%)	897 \pm 59 (7%)	764 \pm 21 (3%)

M - Média; DP - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação

¹ - Média e desvios-padrão de análise, em duplicatas

Tabela 16 - Variação na composição de isômeros de β -caroteno durante o processamento de cenoura (base de sólidos insolúveis)

	Conteúdo de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	Fresca	M \pm DP (CV) Desidratada	Liofilizada
Ensaio 1			
13-cis- β -caroteno	-	588 \pm 0 (0%)	534 \pm 193 (36%)
trans- β -caroteno	1725 \pm 25 (1%)	1090 \pm 255 (23%)	1902 \pm 224 (12%)
9-cis- β -caroteno	-	-	-
Ensaio 2			
13-cis- β -caroteno	116 \pm 43 (37%)	287 \pm 158 (55%)	123 \pm 14 (11%)
trans- β -caroteno	1021 \pm 19 (2%)	1223 \pm 0 (0%)	1701 \pm 159 (9%)
9-cis- β -caroteno	-	59 \pm 17 (29%)	123 \pm 33 (27%)
Ensaio 3			
13-cis- β -caroteno	203 \pm 14 (7%)	209 \pm 3 (1%)	278 \pm 97 (35%)
trans- β -caroteno	1286 \pm 102 (8%)	1477 \pm 53 (4%)	1260 \pm 146 (12%)
9-cis- β -caroteno	129 \pm 6 (5%)	122 \pm 41 (34%)	75 \pm 4 (5%)

M - Média; DP - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação

¹ - Média e desvios-padrão de análise, em duplicatas

A separação das frações na coluna de Ca(OH)_2 depende do lote e, principalmente, da marca do adsorvente utilizado. O Ca(OH)_2 da marca Mallinckrodt foi o único que separou razoavelmente bem esses isômeros nos estudos realizados em nosso laboratório. Com a impossibilidade da aquisição dessa marca, que é importada, outras marcas foram utilizadas (Baker, Nuclear, Art-Lab), inclusive com ativação a 1100°C , por tempos diferentes. O Ca(OH)_2 da marca Nuclear foi o que separou melhor, mas, mesmo assim, a separação não foi eficiente, como pode ser notado por alguns valores bastante altos e variados dos coeficientes de variação (CV), nas Tabelas 15 e 16.

Na literatura, cabe lembrar que os estudos que separaram e quantificaram os isômeros cis, não mostraram a reprodutibilidade do método, apresentando os resultados em porcentagem, sem desvio-padrão e, obviamente, sem nenhum tratamento estatístico.

4.4 - Perdas durante a desidratação e a liofilização do espinafre.

No caso do espinafre, a reprodutibilidade do método já foi testada (Rodriguez-Amaya et al., 1988; Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1989; Kimura et al., 1900). Os problemas com a amostragem foram contornados já que o lote analisado foi pequeno.

Uma vez que a cenoura, que passa por dois processos de branqueamento (Figura 4) e que contém em sua matriz bastante sólidos solúveis, teve perdas relativamente pequenas, foi assumido que o

processamento do espinafre (Figura 5) não causou perda de sólidos solúveis. Portanto, os cálculos foram feitos em base seca (Tabela 17).

4.4.1 - Perdas de carotenóides e valor de vitamina A durante a desidratação e a liofilização (base seca)

A fração principal do espinafre, a mistura de luteína e violaxantina, e a fração de zeaxantina não sofreram alterações significativas ($P < 0,05$), tanto por desidratação como por liofilização (Tabela 18).

O β -caroteno teve perdas significativas ($P < 0,01$) de 12%, equivalentes para os dois processos. Park (1987) encontrou que a desidratação do espinafre reduziu β -caroteno em 29%, enquanto a liofilização reduziu em 19%.

A neoxantina, o carotenóide presente em menor quantidade no espinafre, teve um aumento significativo ($P < 0,01$) de 68% por desidratação, não sendo encontrada no produto liofilizado. Pela sua estrutura básica (Figura 11), a neoxantina não poderia ser formada por epoxidação de outros carotenóides. Porém, é possível que essa epoxidação tenha acontecido, formando outros compostos que eluíram e foram quantificados junto com a neoxantina.

O valor de vitamina A diminuiu na mesma proporção (12%) do β -caroteno, uma vez que este é o único carotenóide encontrado no espinafre com valor de vitamina A.

Tabela 17 - Variação de sólidos insolúveis, sólidos solúveis e sólidos totais, durante a desidratação e a liofilização do espinafre

	Sol. Insolúveis (XST)	Sol. Solúveis (XST)	Sol. Totais (X)	Perdas de sól.sol. em relação à amostra fresca(X)
Fresco	53	47	7	-
Desidratado	53	47	94	11
Liofilizado	53	47	97	11

X ST - Porcentagem de Sólidos Totais

Tabela 18 - Perda de carotenóides e de valor de vitamina A durante o processamento de espinafre (base seca)

Caroteno	Conteúdo de carotenóides($\mu\text{g/g}$) ¹		
	Fresco	Desidratado	Liofilizado
β -caroteno	489a \pm 6	429b \pm 13	430b \pm 34
Luteína + Violax.	1025a \pm 29	1047a \pm 15	1001a \pm 85
Zeaxantina	182a \pm 58	198a,b \pm 8	112a,c \pm 19
Neoxantina	49a \pm 4	156b \pm 37	-
Valor de vitamina A	8158a	7149b	7163b

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

¹ - Médias e desvios-padrão de análises, em triplicata

4.4.2 - Variação da composição isomérica do β -caroteno durante a desidratação e a liofilização do espinafre (base seca)

No caso do espinafre, como a amostra não contém α -caroteno, a separação dos isômeros de β -caroteno na coluna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ teve reprodutibilidade (Tabela 19)

Como pudemos notar, o isômero 9-cis- β -caroteno se apresentou em maior quantidade que o 13-cis- β -caroteno. Após o processamento, essa diferença aumentou mais ainda. Observação semelhante foi relatada por Sweeney e Marsh (1970) durante o enlatamento. Os autores concluíram que os vegetais verdes possuem quantidades maiores de 9-cis- β -caroteno do que 13-cis- β -caroteno, sendo esta diferença mais pronunciada após processamento o término.

Observando os dados da Tabela 20, podemos ver que a separação de isômeros resultou em valores significativos ($P < 0,01$) menores para as amostras frescas e desidratadas, de 14 e 16 %, respectivamente, demonstrando superestimação nos valores de vitamina A, quando os isômeros foram quantificados juntos. Para o produto liofilizado, no entanto, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os valores calculados sem e com separação de isômeros.

Considerando o efeito do processamento, o valor de vitamina A, calculado sem a separação de isômeros, acusou diferença significativa ($P < 0,01$) de 12 e 13 %, respectivamente, para desidratação e liofilização. Quando essa comparação é feita, levando em conta a separação de isômeros, somente a desidratação apre-

Tabela 19 - Variação da composição de isômeros de β -caroteno durante o processamento de espinafre (base seca)

	Conteúdo de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) ¹		
	M \pm DP (CV)		
	Fresco	Desidratado	Liofilizado
13-cis- β -caroteno	57a \pm 1 (2X)	40b \pm 2 (5X)	31b \pm 6 (19X)
trans- β -caroteno	363a \pm 9 (2X)	321b \pm 11 (3X)	306a \pm 25 (6X)
9-cis- β -caroteno	68a \pm 3 (4X)	77a \pm 6 (8X)	94b \pm 7 (7X)
Valor de vitamina A (RE/100g)	7018a	6040b	7362a

M - Média; DP - Desvio-Padrão; CV - Coeficiente de Variação;

¹ - Médias e desvio padrão de análise, em triplicata

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

Tabela 20 - Comparação das mudanças do valor de vitamina A do espinafre (base seca), calculada com e sem separação dos isômeros.

	Valor de vitamina A (RE/100g) ¹		Variação (%) (com e sem isômero)
	sem separação de isômero	com separação de isômero	
Fresca	8150a, (a)	7018a, (b)	14%
Desidratada	7149b, (a)	6040b, (b)	16%
Liofilizada	7163b, (a)	7362a, (a)	-
Perdas (%)			
Desidratada	12	14	
Liofilizada	13	-	

¹ - Médias e desvios-padrão de análise, em triplicata

A mesma letra, na mesma coluna, significa que não houve diferença significativa ($P < 0,05$)

A mesma letra, entre parênteses, na mesma linha, significa que não houve diferença significativa ($P < 0,05$)

sentou perda significativa ($P < 0,01$) de 14 %.

5 - CONCLUSÕES

1. Na cenoura, variedade "Nantes", foram identificados sete carotenóides (cinco carotenos, um monohidroxilado e um dihidroxilado) α -, ρ -, ζ -, δ - e γ -carotenos, α -criptoxantina e luteína, dos quais α - e ρ - carotenos foram os principais.
2. No espinafre, variedade "Nova Zelândia", foram identificados cinco carotenóides: β -caroteno, violaxantina, luteína, zeaxantina e neoxantina, com luteína como carotenóide majoritário.
3. O cálculo da concentração de carotenóides da cenoura, na base seca, não pode ser utilizado para avaliar retenção ou perda, uma vez que a redução de sólidos solúveis pode levar a aumentos falsos.
4. O branqueamento causou perda significativa apenas de β -caroteno (16%) e, mesmo assim, em somente um dos ensaios.
5. A avaliação das perdas na desidratação e na liofilização da cenoura não foi fácil, devido às dificuldades na amostragem e mudanças nas condições dos processamentos, mesmo quando o cálculo é feito em base de sólidos insolúveis.
6. A desidratação e a liofilização não causaram ou resultaram apenas pequenas perdas de carotenóides e valor de vitamina A. A liofilização reduziu um pouco mais o valor de vitamina A que a desidratação.
7. O método analítico, atualmente utilizado mundialmente para a separação de isômeros cis e trans, não é suficientemente confiável para alimentos como a cenoura, que contém tanto α - como β -caroteno.

8. Na desidratação e na liofilização do espinafre, a perda de β -caroteno não foi considerável. Violaxantina, luteína e zeaxantina se mantiveram constantes. A neoxantina teve um aumento (67%) inexplicável na desidratação, não sendo detectada na liofilização.
9. A separação dos isômeros cis-trans do β -caroteno, único carotenoide com atividade provitamínica no espinafre, foi reproduzível.
10. A não separação de isômeros causou superestimação nos valores de vitamina A do espinafre nas amostras fresca e desidratada.
11. A perda do valor de vitamina A, por desidratação do espinafre, calculada sem a separação de isômeros foi, de 16% e, com a separação, 11%.
12. A perda do valor de vitamina A, por liofilização do espinafre, calculada sem e com a separação de isômeros, não teve diferença significativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPAPUNAN, M.A. 1984. Effects of wilting, blanching and storage temperatures on ascorbic acid and total carotenoid content of some Nigerian fresh vegetables. Anal. Plant. Plant Foods Hum. Nutr, 34 : 177
- ALMEIDA, L.B. & PENTEADO, M.V.C. 1987. Carotenóides com atividade pró-vitáminica A de cenouras (*Daucus carota* L) comercializadas em São Paulo, Brasil. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 23 (2) : 133
- ARYA, S.S., NATESAN, V., PARIHAR, D.B. & VIJAYARAGHAVAN, P.K. 1979. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. J. Food. Technol., 14 : 579
- ARYA, S.S., NATESAN, V., PARIHAR, D.B. & VIJAYARAGHAVAN, P.K. 1982. Effect of pre-freezing on the stability of carotenoids in unblanched air-dried carrots. J. Food. Technol., 17 : 109

- BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A. & EDWARDS, R.A. 1977a. Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot. I Leaching losses and carotenoid content. J. Food. Technol., 12 : 285
- BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A. & EDWARDS, R.A. 1977b. Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot. II - Leaching losses and stability of carrot during dehydration and storage. J. Food. Technol., 12 : 295
- BALOCH, A.K., BUCKLE, K.A. & EDWARDS, R.A. 1977c. Separation of carrot carotenoids on hyflosupercel : MgO : calcium sulfate thin-layer. J. Chromatogr., 139 : 149
- BAUERNFEIND, J.C. 1972. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. J. Agric. Food Chem., 20 : 456
- BENDICH, A. 1990. Carotenoids and the immune system. Em "Carotenoid Chemistry and Biology", N. I. Krinsky, M. M. Mathews-Roth, & R. F. Taylor, (Ed.) p.323. Plenum Press, Nova York & Londres
- BILLS, C.H. & McDONALD, F.G. 1932. The carotene content of ten varieties of carrots. Science 76 : 108

- BOOTH, V.H. 1951. Distribution of carotenoids in different parts of carrots. *J. Sci. Food Agric.*, 2 : 350
- BRAUMANN, T. & GRIMME, L.H. 1981. Reversed phase high performance liquid chromatograph of chlorophylls and carotenoids. *Biochem. Biophys. Acta*, 637 : 8
- BRITTON, G. 1988. Biosynthesis of carotenoids. *Em Plant Pigments*. T.W. Goodwing (Ed.), p. 61. Academic Press, Londres e San Diego.
- BUISSHAND, J.G. & GABELMAN, W.H. 1979. Investigations on the inheritance of color and carotenoid content in phloem and xylem of carrots roots (*Daucus carota* L) *Euphytica*, 28 : 611
- BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. 1986. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food Sci.*, 51 :128
- BUSHWAY, R. J. 1985. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 8 : 1527.

- BUSHWAY, R. J. 1986. Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 34 : 409.
- BUSHWAY, R. J. & WILSON, A. M. 1982. Determination of α - and β -carotene in fruits and vegetables by HPLC. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 15: 165.
- BUSHWAY, R. J., YANG, A. & YAMANI, A. M. 1986. Comparison of alpha- and beta-carotene content of supermarket versus roadside stand produce. J. Food Qual., 9 : 437.
- CHAN, H.T., JR. KUD, M.T.H. , CAVALETTI, C.G. & NAKAYAMA, T.O. M. 1975. Papaya puree and concentrate: Changes in ascorbic acid, carotenoids and sensory quality during processing. J. Food Sci., 40 : 701
- CHANDLER, L. A. & SCHWARTZ, S. J. 1987. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. J. Food Sci., 52 : 669.
- CHICHESTER, C.O. & McFEETERS, R. 1971. Pigment degeneration during processing and storage. Em "The Biochemistry of Fruits and their Products", A.C. Hulme (Ed.), Vol. 2, p. 107. Academic Press, London.

- CHOU, H.E. & BREENE, W.M. 1972. Oxidative decoloration of β -carotene in low-moisture model systems. J. Food Sci., 37 : 66
- COLDITZ, G. A., BRANCH, L. G., LIPNICK, R. J., WILLET, W. C., ROSNER, B., POSNER, B. M. & HENNEKENS, C. H. 1985. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. J. Am. Clin. Nutr., 41: 32.
- CURL, A.L. & BAILEY, G.F. 1956. Comparison of carotenoids of Valencia orange juice peel and pulps. J. Agric. Food Chem., 4 : 156
- DAVIES, B. H. 1976. Carotenoids. Em "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", T. W. Goodwin, (Ed.),p 38. Academic Press, London.
- DALAL, K.B. & SALUNKHE, D.K. 1964. Thermal degradation of pigments and relative biochemical changes in canned apricots and cherries. Food. Technol., 18 : 1198

- DAOOD, H.G., CZINKOTAI, B., HOSCHKE, A. & BIACS, P. 1989.
High performance liquid chromatograph of chlorophylls and
carotenoids from vegetables. J. Chromatogr., 472(1) : 926
- DARK, S.O.S. & BOOTH, U.H. 1946. Total carotenoids in carrots.
J. Agric. Sci., 36 : 192
- DELLA-MONICA, E.S. & McDOWELL, P.E. 1965. Comparison of
-carotene content of dried carrots prepared by three
dehydration process. Food Technol., 19 : 141
- DEUL, H.G., Jr. 1957. Biochemistry, biosynthesis, oxidation,
metabolism and nutritional value. Em "The Lipids, their
Chemistry and Biochemistry" Vol. III. Interscience Pu-
blishers, Nova York
- EDWARDS, C.G. & LEE, C.Y. 1986. Measuremnet of provitamin A
carotenoids in fresh and canned carrots and green peas. J.
Food Sci., 51(2) : 534
- EL-TINAY, A.H. & CHICHESTER, C.O. 1970. Oxidation of β -caro-
tene. Site of initial attack. J. Org. Chem., 35 : 2290

- EMSWELLER, S.L., BURRELL, P.C. & BORTHWICK, H.A. 1935. Studies on inheritance of color in carrots. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 33 : 508
- ESKINS, K., SCHOLFIELD, C. R. & DUTTON, H. J. 1977. High-performance liquid chromatography of plant pigments. J. Chromatogr., 135: 217.
- FRANCO, G. 1982. Nutrição "Texto básico e tabela de composição química dos alimentos". Livraria Ateneu, Rio de Janeiro.
- GAVA, A.T. 1986. Princípios de Tecnologia de Alimentos. 7ª Ed. Nobel, São Paulo, Brasil.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1987. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. Int. J. Food Sci. Technol., 22 : 451
- GOLDBLISTL, S.A., KAUEL, M. & LUSK, G. 1963. Freeze dehydration of foods. J. Food Technol., 17(2) : 139
- GOMEZ, M.I. 1981. Carotene content of some green leafy vegetables of Kenia and effects of dehydration and storage on carotene retention. J. Plant Foods, 3 : 231

- GOODWIN, T.W. 1954. Carotenoids, their Comparatives Biochemistry". Chemical Publishs Company, Nova York.
- GOODWIG, T.W. 1966. The carotenoids. Em " Comparative Phytochemistry", T. Swain (Ed.), p. 121. Academic Press, Londres.
- GOODWIN, T. W. 1976. Distribution of carotenoids. Em "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". 2nd ed. T.W. Goodwin (Ed.), p 225. Academic Press, Londres.
- GOODING, E.G.B., TUCKER, C.G. & MacDOUGALL, D.B. 1960. Dehydration of carrots. Food Manuf.,(June) : 249
- GROSS, J. GABAI, M. & LIFHITZ, A. 1971. Carotenoids in juice of Shamouti orange. J. Food Sci., 12 : 2259
- GROSS, J. GABAI, M., LIFHITZ, A. & SKLARTZ, B. 1973. Carotenoids in pulp, peel and leaves of Persea americana. Phytochem., 12 : 2259
- HARPER, R.H. & ZSCHEILE, F.P. 1945. Carotenoid content of carrot varieties and strains. Food Res.,10 (6) : 84

- HEINONEN, M.I., OLLILAINEN, U. LINKOLA, E.K., VARO, P.T. & KOIVISTOINEN, P.E. 1989. Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits and Berries. J. Agric. Food Chem., 37 : 655
- HEINONEN, M.I. 1990. Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. J. Agric. Food Chem., 38 : 609
- HIRAYAMA, O. & OIDO, H. 1969. Changes of lipid and pigment composition in spinach leaves during storage. J. Agric. Chem. Soc. Japan, 43: 423.
- HSIEH, Y. P. C. & KAREL, M. 1983. Rapid extraction and determination of α - and β -carotenes in foods. J. Chromatogr., 259: 515.
- HUET, R. 1979. Extraction, dosage et stabilisation des carotenoids d'agrumes. Fruits., 34 : 479
- IMAN, M.K. & GABELMAN, W.H. 1968. Inheritance of carotenoids in carrots, *Daucus carota* L. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 93 : 419

INCAP-ICNND. 1961. Food Composition Table for Use in Latin America. Institute of Nutrition of Central America and Panama, Guatemala

IRIYAMA, K., YOSHIURA, M. & SHIRAKI, M. 1978. Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using HPLC. J. Chromatogr., 154 : 302.

IRIYAMA, K., YOSHIURA, M., SHIRAKI, M, YANO, S. & SAITO, S. 1990. An improved method for the rapid and easy separation of leaf pigments and their derivatives by thin-layer chromatography. Anal. Biochem., 106 : 322.

ISAKSEN, M. & FRANCIS, G.W. 1989. Preparative HPLC of carotenoids. Chromat., 27(7/8) : 325

JAVOR, T., BATA, M., LAVASZ, L., MORAN, F., NAGY, L., PATTY, I., SZABOKS, J., TARNOK, F., TOTH, G. & MOZSIK, G. 1983. Gastric cytoprotective effects of vitamin A and other carotenoids. Int. J. Tissue React., 5 : 289.

KAKUTANI, Y., OGAWA, S. & HAMANA, K. 1983. Quantitative analysis of carotenoids by high performance liquid chromatography. Bull. Kobe Women's University 16 : 17

KAKUTANI, Y & KIKU, N. 1988. Improvement of the separation and quantitative analysis of carotinoid by HPLC. Bull. Kobe Women's University, 21(2) : 273

KEMMERER, A.R. & FRAPPS, G.S. 1943. Constituents of carotene extracts of plants. Ind. Eng. Chem., 15 : 714.

KEMMERER, A.R. & FRAPPS, G.S. 1945. Constituent of crude carotene of carrots. Food Res., 10(6) : 457

KHACHIK, F., BEECHER, G. R. & WHITTAKER, N. F. 1986. Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 34: 603.

KHACHIK, F., & BEECHER, G. R.. 1987. Applications of a 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

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

KIMURA, S. & SHIODA, K. 1963. Citado em Chichester, C.O. & McFeeters, R. 1971. Pigment degeneration during processing and storage. Em "The Biochemistry of Fruits and their Products", A.C. Hulme (Ed.), Vol. 2, p. 107. Academic Press, Londres.

KLAUI, H. & BAUERNFEIND, J.C. 1981. Carotenoids as food colors. Em "Carotenoids and colorants and vitamin A precursors", J. C. Bauernfeind (Ed.), p. 156. Academic Press, Nova York

KUHN, R., WINTERSTEIN, A. & LEDERER, E. 1931. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 197 : 141 citado em Strain, H.H. 1954. Leaf xanthophylls: The action of acids on violaxanthin, violeoxanthin, Taraxanthin and tareoxanthin. Arch. Biochem. Biophys., 48 : 458

LAFERRIERE, L. & GABELMAN, W.H. 1968. Inheritance of color, total carotenoids, α -caroteno and β -caroteno in carrots, *Daucus carota* L. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 93 : 408

- LEE, C. Y. 1986. Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. Food Chem., 20 : 285
- LEE, F.A. 1945. Vitamin retention in blanched carrots - Alcohol-insoluble solids as a reference base. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.), 17 : 719
- LEMPKA, A. & PROMINSKY, W. 1967. Nahrung. 11 :267 citado em Klaui, H. & Bauernfeind, J.C. 1981. Carotenoids as food colors. Em "Carotenoids and colorants and vitamin A precursors", J. C. Bauernfeind (Ed.), p. 156. Academic Press, Nova York
- LIVINGSTON, A.L., KNOWLES, R.E., NELSON, J.W. & KOHLER, G.O. 1968. Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfafa processing. J. Agric. Food Chem., 16(1) : 84
- LOVRIC, T., SABLJK, Z., BOSKOVIC, M. 1970. Cis-trans isomerization of lycopene and colour stability of foam mat storage. J. Sci. Food Agric., 21(2) : 641.
- MACKINNEY, G., LUCKTON, A. & GREENBAUN, L. 1958. Carotenoid stability in stored dehydrated carrots. Food Technol.,

- MATHEWS-ROTH, M. M. 1981. Carotenoids in medical applications. Em: Carotenoids as Colorant and Vitamin A Precursors. Bauernfeind, J. C. (Ed.), p. 755 Academic Press, Nova York.
- MATHEWS-ROTH, M. M. 1982. Antitumor activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology*, 39 : 33.
- MATHEWS-ROTH, M. M. 1985. Carotenoids and cancer prevention-experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.*, 57 : 717.
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1989. Comparision of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. *Chromatographya*, 28(5/6) : 249
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian leafy vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 25 : 213
- MIERS, J.C., WONG, F.F., HARRIS, J.G. & DIETRICH, W.C. 1968. Factors affecting storage stability of spray-dried tomato

powder. Food Technol., 12 : 542.

MOSS, G.P. & WEEDON, B.C.L. 1976. Chemistry of the carotenoids. Em "Chemistry and biochemistry of Plant Pigments" T.W. Goodwin (Ed.), 2 nd ed, vol.1, p. 149. Academic Press, Londres.

MOSZIK, G., BATA, M., JAVDR, T., MORON, F., SZABOLCS, J. & TOTH, G. 1989. Cytoprotective effect of vitamin A and carotenoids on the injury of gastric mucosa caused by 0,6M hydrochloric acid. Taplakozastud Helyzethe Fedalattia Magyarorszagon., 8 : 781

MULUANEY, T.R. 1990. Vegetable Products, Processed. Em Official Methods of Analysis. 15 th ed. Helrich, K. (ed.), p. 989-990. ADAC, Arlington, USA.

NAC-NRC. 1980. Recommended Dietary Allowances. 9 th ed. National Academy of Sciences, Washington; D.C. p. 55-71.

- NOGUEIRA, J.N., SOBRINHO, J.S., VENCOSVY, R. & FONSECA, H.
1978. Efeito do armazenamento nos teores de ácido ascórbico e β -caroteno em goiaba (*Psidium guajava* L) liofilizada. Arch. Latinamer. Nutr., 28 : 363
- OGUNLESI, A.T. & LEE, C.Y. 1979. Effect of thermal processing on the stereoisomerization of major carotenoids and vitamin A value of carrots. Food. Chem., 4 : 311
- PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1987. Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. Acta Aliment., 16(3) : 209.
- PANALACKS, T. & MURRAY, T.K. 1970. The effect of processing on the content of carotene isomers in vegetables and peaches. Inst. Can. Technol. Aliment., 3(4) : 145
- PARARINCEVIC-TRAJKOVIC, J. & BARA, J. 1970. Hrana Ishrana 11 : 325. Citado em Klaui, H. & Bauernfeind, J.C. 1981. Carotenoid as food colors. Em: "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors", J. C. Bauernfeind (Ed.), p. 172. Academic Press, Nova York.

- PARK, Y.W. 1987. Effect of freezing, thawing, drying and cooking on carotene retention in carrots, broccoli and spinach. *J. Food Sci.*, 52(4) : 1022
- PENTEADO, M.V.C., MINAZZI, R.S. & ALMEIDA, L.B. 1986. Carotenóides e atividade provitamínica A de folhas de hortaliças consumidas no norte do Brasil. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, 22 : 97
- PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J. D. & SPORN, M. P. 1981. Can dietary β -carotene materially reduce human cancer? *Nature*, 290 : 201.
- POL, F. van der, PURNOMO, S.U. & van ROSMALEN, H.A. 1988. Trans-cis isomerization of carotenes and its effects on the vitamin A potency of some common Indonesian foods. *Nutr. Reports Int.*, 37(4) : 785
- POPOVSKII, V.G., IVASYUK, N.T. & KREPONSOVA, A.N. 1968. *Tr. Mold. Nauchno-Issled. Inst. Pishch. Prom-sti.* 8 : 20. Citado em Klaui, H. & Bauernfein, J.C. 1981. Carotenoids as food colors. Em "Carotenoids and Colorants and Vitamin A Precursors", J.C. Bauernfein (Ed.), p. 172. Academic Press, Nova York.

- QUACKENBUSH, F. W. 1987. Reverse phase HPLC separation of cis and trans carotenoids and its application to β -carotenes in food materials. J. Liq. Chromatog., 10 : 643.
- RAMOS, D. M. R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1987. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. J. Micronutrients Anal., 3 : 147.
- RODRIGUEZ, D. B., RAYMUNDO, L.C., LEE, T. C., SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. 1976. Carotenoid pigment changes in ripening Momordica charantia fruits. Ann. Bot., 40 : 615.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1985. Os carotenóides como precursores de vitamina A. Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim., 19 : 227
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. Assesment of pro-vitamin A determination by open column chromatography visible absorption spectrophotometry. J. Chromatogr. Sci., 26 : 624
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1989. Critical review of provitamin A determination in plant foods. J. Micronutrient Anal., 5 : 191

- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1991. Carotenoids: Properties and analysis. Em "Encyclopaedia of Food Science and Nutrition. Academic Press, Londres (no prelo)
- ROUCHAUD, J., MOONS, C. & MEYER, J.A. 1985. The effects of selected herbicide and fungicide treatments on the carotenes and xanthophylls in lettuce. *J. Hort. Sci.*, 60 : 245
- RYGG, C.L. 1949. Changes in carotenoid content of harvest carrots. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 54 : 307
- SADANA, J.C. & AHMAD, B. 1947. The carotenoid pigments and the vitamin A activity of Indian carrots. *Ind. J. Med Res.*, 35(2) : 81
- SCHWARTZ, S.J. & KILLAN-PATRONI, M. 1985. Detection of cis-trans carotene isomers by two-dimensional thin-layer and HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 33 : 1160
- SHEKELLE, R. B., LIU, S., RAYNOR, W. J., LEPPER, M., MALIZA, C., ROSSOF, A. H., PAUL, D., SHRYOCK, A. N. M. & STAMLER, J. 1981. Dietary vitamin a and risk of cancer in the western electric study. *Lancet*, 2 : 8257.

- SIMON, P.W. & WOLFF, X.Y. 1987. Carotenes in typical and dark orange carrots. *J. Agric. Food Chem.*, 35 : 1017
- SIMPSON, K. L. 1983. Relative value of carotenoids and precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.*, 42 : 7
- SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. D. 1981. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.*, 1 : 351.
- STEFANOVICH, A.F. & KAREL, M. 1982. Kinetics of β -carotene degradation at temperature typical of air drying of foods. *J. Food Process. Preserv.*, 6(4) : 227
- STRAIN, H.H. 1939. XI - Isolation and detection of β -carotene and the carotenes of carrot roots and of butter. *J. Biol. Chem.*, 127 : 191
- STRAIN, H.H. 1954. Leaf xanthophylls: The action of acids on violaxanthin, violaxanthin, taraxanthin and tereoxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 : 458

- STRANSKY, H.Z. 1978. Naturforsch .33 : 836 em Khachik, F., Beecher, G.R. & Whittaker, N.F. 1986. Separation, Identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatograph. J. Agric. Food Chem., 34 : 603
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1970. Separation of carotene stereoisomers in vegetables. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53 : 937.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1971 (a). Effect of processing on provitamin A in vegetables. J. Am. Diet. Assoc., 59 : 238.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1971 (b). Effects of selected herbicides on provitamin A content of vegetables. J. Agric. Food Chem., 19 : 854.
- TOMIOKA, K., IMAYA, R., ENDO, K. & YAMAMOTO, Y. 1973. Kasei gaku Zasshi 24(8) : 688. Citado em Klaui, H. & Bauernfein, J.C. 1981. Carotenoids as food colors. Em "Carotenoids and Colorants and Vitamin A Precursors", J.C. Bauernfeind (Ed.), p. 172. Academic Press, Nova York.

TOMKINS, R.G., MAPSON, L.W., ALLEN, R.J.L., WAGER, H.G. & BARKER, J. 1944. J. Soc. Chem. Ind. 63 : 225. Citado em Arya, S.S., Natesan, V., Parihar, D.B. & Vijayaraghavan, P.K. 1979. Stability of carotenoids in dehydrated carrots. J. Fd. Technol., 14 : 579

UMIEL, N. & GABELMAN, W.H. 1971. Analytical procedures for detecting carotenoids of carrot (*Daucus carota* L) roots and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. J. Am. Soc. Hort. Sci., 96(6) : 702

UMIEL, N. & GABELMAN, W.H. 1972. Inheritance of root color and carotenoid synthesis in carrot, *Daucus carota* L; orange vs. red. J. Am. Soc. Hort. Sci., 97(4) : 453

TANNENBAUM, S.R. 1976. Vitamins and Minerals. Em "Principles of food science - Food Chemistry", D.R. Fenema (Ed.), Part I, p. 377. Marcel Dekker Inc., Nova York and Basel.

TIEDJENS, V.A. 1943. The Vegetable Encyclopedia and Gardener's Guide. Avenel Books, Nova York.

WALL, M.E. & KELLEY, E.G. 1943. Determination of pure carotene in plant tissue - A rapid chromatographic method. Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.), 15(1) : 18

- WECKEL, K.G., SANTOS, B., HERNAN, Ed, LAFERIERRE, L. & GABEL
MAN, W.H. 1962. Carotene components of frozen and
processed carrots. Food Technol., 16 : 91
- WEIER, T.E. 1944. Carotene degradation in dehydrated carrots.
II - Stability of carotene in carrot tissue kept in moist
air at 60°C. Am. J. Bot., 31(9) : 537
- WEIER, T.E. & STOCKING, C.R. 1946. Stability of carotene in
dehydrated carrots impregnated with antioxidants. Science,
104 : 437
- WONG, F.F. & BOHART, G.S. 1957. Observations on the color of
vacuum-dried tomato juice powder during storage. Food
Technol., 11 : 293
- YAMAGUCHI, M. & SUGIYAMA, T. 1960. The carotenoid content of
Kintoki e Kokubu varieties of carrots grown in Japan. J.
Hort. Assoc. Japan, 29 : 310.
- ZECHMEISTER, L. 1949. Stereoisomeric provitamin A. Em "Vita
mins and Hormones" vol 7. Academic Press, New York