

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 Ciências de Alimentos.

Provas

Esta tese foi aprovada em todas as matérias exigidas para a obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos, e aprovada pela Comissão Julgadora em 17.12.89
Campinas, 19 de dezembro de 1989.

Des. A. G.

REAVALIAÇÃO DE METODOS ANALITICOS E
DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE
CAROTENOIDES E VALOR DE
VITAMINA A EM MAMÃO E CAJA

MIEKO KIMURA

Engenheira de Alimentos

DRA. DELIA RODRIGUEZ-AMAYA

Orientadora

CAMPINAS-1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

35/89

BANCA EXAMINADORA

Délia p. Amaya

PROFA. DRA. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA
(ORIENTADORA)

Admar Costa de Oliveira

PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
(MEMBRO)

Helôisa M. Cecchi

PROFA. DRA. HELOISA MÁSCIA CECCHI
(MEMBRO)

Suplente

PROFA. DRA. EVA GONÇALVES MAGALHÃES
(MEMBRO)

Campinas, /9 de Dezembro de 1989

A SATIE

minha irmã e amiga

pelo

carinho, apoio e incentivo

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Profa. Délia Rodriguez-Amaya, pela orientação segura e dedicada, bem como, pela confiança e apoio recebidos durante o desenvolvimento da tese.

A esta pessoa que retrata fielmente a palavra "sensei", que soube aliar a seriedade de trabalho à amizade e compreensão, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a CAPES-Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelos auxílios concedidos.

Aos Profs. Admar Costa de Oliveira, Eva Gonçalves Magalhães e He-loisa Máscia Cecchi, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese.

Aos Profs. Waldomiro Sgarbieri e Paulo A. Bobbio e ao ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos, por permitir a utilização do espectrofotômetro.

A todos do laboratório de Análise de Alimentos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos, cujos apoio e incentivo foram fundamentais para que esse momento se tornasse realidade.

A Telma Sílvia T. A. Sallum, diretora técnica da Secretaria de Pós-Graduação, pela constante atenção.

A ABIA-Associação das Indústrias de Alimentação, pelas cópias do trabalho.

INDICE

	página
INDICE DE TABELAS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	x
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	 4
2.1. Métodos analíticos para determinação de carotenóides.....	4
2.1.1. Extração.....	5
2.1.2. Saponificação.....	7
2.1.3. Separação cromatográfica.....	9
2.1.3.1. Cromatografia em camada delgada....	9
2.1.3.2. Cromatografia em coluna aberta.....	11
2.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	13
2.1.4. Identificação.....	14
2.1.5. Quantificação.....	14
2.2. Métodos analíticos para determinação de provitamina A.....	15
2.2.1. Método da ADAC.....	17

	página
2.2.2. Método da COST.....	19
2.2.3. Métodos por CLAE.....	20
2.3. Carotenóides de mamão.....	21
3. MATERIAL E METODOS	
3.1. Amostragem e preparo de amostras.....	26
3.1.1. Amostras alimentícias.....	26
3.1.2. Carotenóides sintéticos.....	27
3.2. Determinação de carotenóides segundo método des- crito por Rodriguez et al. (1976a).....	27
3.3. Determinação do valor de vitamina A.....	32
3.3.1. Determinação do valor de vitamina A segundo método da AOAC.....	32
3.3.2. Determinação do valor de vitamina A segundo método de Rodriguez et al. simplificado.....	33
3.4. Avaliação da etapa de extração.....	34
3.5. Avaliação da etapa de saponificação.....	35
3.6. Determinação da composição de carotenóides de ma- mão e cajá.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Avaliação do método analítico.....	39
4.1.1. Etapa de extração.....	39
4.1.2. Etapa de saponificação.....	42
4.1.2.1. Efeito da saponificação em carote- nóides sintéticos.....	43

	página
4.1.2.2. Efeito da saponificação em carotenóides de couve e mamão.....	53
4.2. Determinação quantitativa de provitamina A de frutas e vegetais.....	57
4.2.1. Avaliação do método da AOAC.....	57
4.2.2. Avaliação do método de Rodriguez et al. simplificado.....	62
4.3. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de mamão.....	65
4.3.1. Caracterização dos carotenóides encontrados em mamão.....	65
4.3.2. Diferenças entre cultivares.....	75
4.3.3. Efeito geográfico.....	77
4.3.4. Comparação do valor de vitamina A.....	79
4.4. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de cajá.....	82
5. CONCLUSÕES.....	91
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	94

INDICE DE TABELAS

	página
1. Composição de carotenóides de mamão Bangalore.....	23
2. Composição de carotenóides de mamão determinada por CLAE.....	25
3. Avaliação da etapa de extração na determinação de caro- tenóides de couve.....	40
4. Perda (%) de β -apo-8'-carotenal durante a saponifica- ção.....	44
5. Carotenóides (μ g) formados durante a saponificação de β -apo-8'-carotenal.....	46
6. Perda (%) de β -caroteno durante a saponificação.....	49
7. Carotenóides (μ g) formados durante a saponificação de β -caroteno.....	51
8. Efeito da saponificação à frio na composição de carote- nóides (μ g/g) e valor de vitamina A (UI/100g) de couve..	54
9. Efeito de dois procedimentos de saponificação na compo- sição de carotenóides (μ g/g) de mamão.....	56
10. Composição de carotenóides da fração de "carotenos" de mamão obtida pelo método da AOAC.....	59
11. Comparação do valor de vitamina A obtido pelo método da AOAC e pelo método de Rodriguez et al. simplificado..	61
12. Repetibilidade do método de Rodriguez et al. simplifi- cado.....	64

	página
13. Caracterização dos carotenóides encontrados em mamão....	66
14. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) de mamões cultivares Comum, Solo, Formosa e Tailândia.....	76
15. Efeito geográfico na composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) de mamão cultivar Formosa.....	78
16. Comparação do valor de vitamina A de quatro cultivares de mamão.....	80
17. Caracterização dos carotenóides encontrados em cajá.....	83
18. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (UI/100g) de cajá.....	89

INDICE DE FIGURAS

página

1. Espectros de absorção em éter de petróleo dos carotenóides formados durante a saponificação do β -apo-8'-carotenal.....	47
2. Espectros de absorção em éter de petróleo dos carotenóides formados durante a saponificação do β -caroteno...	52
3. Espectros de absorção dos carotenóides constituintes da fração de carotenos obtida pelo método da AOAC.....	60
4. Estruturas dos carotenóides encontrados em mamão.....	67
5. Separação dos carotenóides de mamão cultivar Comum.....	68
6. Separação dos carotenóides de mamão cultivar Solo.....	69
7. Separação dos carotenóides de mamão cultivares Formosa e Tailândia.....	70
8. Espectros de absorção em éter de petróleo do β -caroteno, β -criptoxantina, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e criptoflavina.....	71
9. Espectros de absorção em éter de petróleo do β -caroteno e licopeno.....	72
10. Espectros de absorção em éter de petróleo do β -zeaxoteno e γ -caroteno.....	73
11. Estruturas dos carotenóides encontrados em cajá.....	84
12. Separação dos carotenóides de cajá.....	85
13. Espectro de absorção em éter de petróleo do α -caroteno, zeinoxantina e luteína.....	86

RESUMO

Devido aos resultados conflitantes e indefinições ainda existentes quanto à metodologia adequada para determinação da composição de carotenóides e valor de vitamina A de frutas e vegetais, as etapas mais polêmicas do procedimento analítico foram estudadas.

A eficiência de quatro solventes comuns de extração foi avaliada utilizando couve como amostra. As amostras extraídas com acetona apresentaram teores levemente superiores às extraídas com éter de petróleo-acetona e hexana-acetona em termos de β -caroteno e significativamente maiores em termos de luteína. A extração com metanol dificultou a posterior transferência dos pigmentos para éter de petróleo, causando redução significativa especialmente de luteína. O efeito de agentes antioxidantes (BHT e pirogalol) e neutralizante ($MgCO_3$) também foi investigado. Nenhuma diferença significativa foi observada nos conteúdos de β -caroteno e luteína, embora da última ligeiramente maior, como consequência da adição destes agentes.

Seis procedimentos de saponificação foram avaliados utilizando como amostras dois carotenóides sintéticos (β -apo-8'-carotenal e β -caroteno) e duas amostras alimentícias (couve e mamão). Saponificações à quente causaram perdas maiores e formação de cis e epoxi carotenóides. A degradação foi agravada pelo

contato mais direto entre os carotenóides e o álcali. O procedimento da AOAC que envolve saponificação na presença de acetona levou à completa transformação do β -apo-8'-carotenal a citranaxantina. A etapa de saponificação mostrou ser desnecessária para couve, mas foi indispensável para obter uma boa separação dos carotenóides de mamão. Saponificação dos carotenóides dissolvidos em éter de petróleo com adição de igual volume de solução metanólica de KOH 10%, por uma noite à temperatura ambiente hidrolisou completamente os ésteres de carotenóis e apresentou melhor retenção dos pigmentos.

O método da AOAC para determinação do valor de vitamina A mostrou ser inadequado por várias razões: 1-o volume do solvente de extração é fixo; 2-carotenóides menos ativos ou inativos são igualmente quantificados como β -caroteno; 3- carotenóides ativos podem ser desconsiderados. Quando comparado com o método de Rodriguez et al. (1976a) simplificado, o método da AOAC apresentou um valor ligeiramente menor para a couve, aparentemente decorrente da quantidade insuficiente do solvente de extração, e para o mamão, uma superestimação de 131% devido ao cômputo do γ -caroteno, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e parte da β -criptoxantina como sendo β -caroteno. O método de Rodriguez et al. simplificado além de ser versátil e considerar apenas os carotenóides ativos com suas respectivas atividades, apresentou repetibilidade comparável aos métodos que empregam a CLAE.

A composição completa de carotenóides e valor de vitami-

na A de mamão e cajá foram determinadas utilizando o método de Rodriguez et al. (1976a). No mamão, as diferenças entre cultivares e influência da região de cultivo também foram investigadas. Nove carotenóides foram identificados no mamão: β -caroteno, γ -caroteno, β -zeacaroteno, δ -caroteno, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, β -criptoxantina, anteraxantina, criptoflavina e licopeno. O β -zeacaroteno e criptoflavina foram detectados apenas na cultivar Comum, enquanto o δ -caroteno só foi encontrado na cultivar Solo. Foi observado nos mamões de polpa amarela (Comum) a ausência total do licopeno, que nos mamões de polpa vermelha (Solo, Formosa e Tailândia) é o carotenóide principal. Também a anteraxantina foi encontrada somente nos mamões de polpa vermelha. Os mamões "Formosa" cultivados na Bahia apresentaram, com exceção do 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, teores maiores de carotenóides, especialmente de β -caroteno, que acarretou um valor de vitamina A marcadamente superior que os produzidos em São Paulo. Os valores médios de vitamina A foram de 1.934, 1.377, 1.199, 1.118 e 988 UI/100g para as cultivares Formosa (Bahia), Tailândia, Solo, Comum e Formosa (São Paulo) respectivamente, sendo os principais carotenóides precursores o β -caroteno e a β -criptoxantina.

No cajá foram identificados sete carotenóides: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, zeinoxantina, β -criptoxantina, criptoflavina e luteína. A β -criptoxantina foi o carotenóide principal e o que mais contribuiu no valor de vitamina A. A remoção da casca causou uma redução de 28% no valor de vitamina A.

SUMMARY

Due to conflicting results and lack of definitions still existing in terms of the adequate methodology for determination of carotenoids and vitamin A value of fruits and vegetables, the more controversial steps of the analytical procedure were studied. Utilizing kale as test material, the efficiency of common extracting solvents was assessed. Samples extracted with acetone were slightly higher than those extracted with mixtures of hexane-acetone and petroleum ether-acetone in terms of β -carotene and significantly higher in terms of lutein. Extraction with methanol made the posterior transfer of the pigments to petroleum ether more difficult, causing significant reduction especially of lutein. The effect of antioxidant (BHT and pyrogallol) and neutralizing (MgCO_3) agents was also investigated. No significant difference was observed in both β -carotene and lutein, although the latter was slightly higher, as a consequence of the addition of these agents.

Six saponification procedures were assessed, utilizing as test materials two synthetic carotenoids (β -apo-8'-carotenal and β -carotene) and two food samples (kale and papaya). Hot saponification resulted in greater losses and formation of cis and epoxy carotenoids. The degradation was aggravated by more direct contact between the carotenoids and the alkali. The AOAC

procedure, which involves saponification in the presence of acetone, led to complete transformation of β -apo-8'-carotenal to citranaxanthin. Saponification was found unnecessary for kale but was indispensable for good separation of papaya carotenoids. Saponification of the carotenoids dissolved in petroleum ether with equal volume of 10% methanolic KOH overnight at room temperature completely hydrolyzed the carotenol esters and presented better pigment retention.

The AOAC method for the determination of the vitamin A value proved inadequate for various reasons: 1-the volume of the extracting solvent is fixed; 2-less active or inactive carotenoids are equally quantified as β -carotene; and 3-active carotenoids can to be disregarded. When compared with the method of Rodriguez et al. (1976a) simplified, the AOAC method presented slightly lower value for kale, apparently due to the insufficient amount of extracting solvent used, and an overestimation of 131% for papaya, due to the inclusion of γ -carotene, 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin and part of β -cryptoxanthin as β -carotene. The Rodriguez et al. method, aside from being versatile and considers only the active carotenoids with their respective activities, presented repeatability comparable with HPLC methods.

The complete carotenoid composition and vitamin A value of papaya and "cajá" were determined utilizing the Rodriguez et al. (1976a) method. In papaya, cultivar differences and geographic effects were also investigated. Nine carotenoids were identified

in papaya: β -carotene, γ -carotene, β -zeacarotene, δ -carotene, 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin, antheraxanthin, cryptoflavin and lycopene. β -Zearotene and cryptoflavin were detected only in the Common cultivar, while δ -carotene was encountered only in the Solo cultivar. Lycopene, the principal pigment of the red-fleshed papayas (Solo, Formosa and Tailândia), was inexistent in the yellow-fleshed papaya (Common). Antheraxanthin was also only encountered in the red-fleshed papayas. The Formosa papayas cultivated in Bahia presented, except for 5,6-monoepoxy- β -cryptoxanthin, higher levels of carotenoids, especially of β -carotene, resulting in a vitamin A value markedly superior than that of the Formosa papayas produced in São Paulo. The average vitamin A values obtained were 1.934, 1.377, 1.199, 1.118 and 988 UI/100g for the papaya cultivars Formosa (Bahia), Tailândia, Solo, Common and Formosa (São Paulo), respectively, the principal carotenoid precursors being β -carotene and β -cryptoxanthin.

In "cajá", seven carotenoids were identified: α -carotene, β -carotene, γ -carotene, zeinoxanthin, β -cryptoxanthin, cryptoflavin and lutein. β -Cryptoxanthin was the principal carotenoid and that which contributed most to the vitamin A value. The removal of the peel caused a reduction of 28% in the vitamin A value.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides constituem uma classe de pigmentos que sempre despertou o interesse de pesquisadores de diversas áreas devido às várias funções que lhe são atribuídas. Em alimentos, a sua atuação como corantes naturais e precursores de vitamina A são bem reconhecidas. Nos últimos anos, esses compostos voltaram a ocupar um lugar de destaque devido aos estudos demonstrando que mesmo aqueles que não apresentam atividade vitamínica A, exercem ação inibidora de determinados tipos de câncer e protetora das mucosas contra úlceras gástricas (Moszik et al., 1983; Ong e Chytil, 1983; Colditz et al., 1985; Mathews-Roth, 1985; Bendich, 1989a; Ziegler, 1989; Krinsky, 1989). Assim, o consumo de alimentos ricos em carotenóides vem sendo recomendado (Bendich, 1989b) e a importância da determinação da composição completa está finalmente, começando a ser reconhecida. Do ponto de vista tecnológico, a composição completa é também importante, uma vez que a cor dos alimentos e a sua retenção durante o processamento, dependem do tipo e quantidade dos pigmentos presentes (Padula e Rodriguez-Amaya, 1987; Godoy e Rodriguez-Amaya, 1987).

Apesar dos carotenóides serem objeto de intenso estudo já por muitos anos, existem ainda na literatura divergências quanto à metodologia adequada para determinação de carotenóides e valor de vitamina A de frutas e vegetais e as composições de carotenóides e valores de vitamina A reportados são conflitantes

e muitas vezes pouco confiáveis.

A principal dificuldade encontrada para se fixar um método geral que seja adequado para todos os tipos de amostras, reside na existência natural de um grande número de carotenóides e na forma diversificada com que eles se encontram distribuídos nas várias amostras. Um outro problema é a sua susceptibilidade à degradação. Portanto, para execução dos diversos passos da análise, é necessário encontrar meios que permitam alcançar os objetivos de cada etapa, resguardando ao mesmo tempo a integridade dos carotenóides.

Embora a natureza brasileira ofereça uma variedade de frutas e hortaliças ricas em carotenóides, a identificação e quantificação adequada desses pigmentos iniciou-se somente à partir de 1980 com a determinação da composição de carotenóides e valor de vitamina A do cajú e maracujá (Cecchi e Rodriguez-Amaya, 1981 a,b). Desde então foram determinadas as composições completas de carotenóides do tomate mineiro (Rodriguez-Amaya et al., 1983), goiaba (Padula e Rodriguez-Amaya, 1986), mandioquinha (Almeida e Penteado, 1987a), tomate (Tavares e Rodriguez-Amaya, 1988), manga (Godoy e Rodriguez-Amaya, 1988), cucurbitáceas e moranga (Arima e Rodriguez-Amaya, 1988a,b) e hortaliças nativas (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1988) e de provitaminas de cenoura (Almeida e Penteado, 1987) e vegetais folhosos (Ramos e Rodriguez-Amaya, 1987). As composições do mamão e cajá ainda não foram estudadas.

O presente trabalho teve portanto, como objetivos: 1- avaliar as etapas mais polêmicas do procedimento analítico para determinação de carotenóides: extração e saponificação; 2- avaliar o método da AOAC utilizado para determinação do valor de vitamina A; 3- avaliar o método de Rodriguez et al. (1976a) simplificado para determinação de provitamina A; 4- determinar a composição de carotenóides e valor de vitamina A do mamão, verificando as diferenças entre cultivares e influência da região de cultivo e 5- determinar a composição de carotenóides e valor de vitamina A do cajá.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Os carotenóides, na sua maioria, possuem uma estrutura básica de 40 carbonos, formada por oito unidades de isopreno (C_5H_8) unidas por ligações tipo "cabeça-cauda", com exceção da posição central onde a ligação é do tipo "cauda-cauda". Esta estrutura acíclica pode ser modificada por hidrogenação, dehidrogenação, ciclização, hidroxilação ou oxidação, dando origem aos mais de 500 diferentes carotenóides até hoje conhecidos.

O grande número de ligações duplas conjugadas responsáveis pela característica cromófora do pigmento, tornam-os ao mesmo tempo bastante susceptíveis à isomerização e oxidação. São, portanto, especialmente sensíveis à luz, calor, oxigênio, ácidos e alguns deles ao álcali, condições que devem ser evitadas durante as análises (Davies, 1976 e Liaaen-Jensen, 1971).

2.1. Métodos analíticos para determinação de carotenóides

Os métodos analíticos para determinação de carotenóides geralmente evoluem as etapas de extração, saponificação, separação cromatográfica, identificação e quantificação.

2.1.1. Etapa de extração

Considerando a alta porcentagem de água contida nas amostras frescas e a lipossolubilidade da maioria dos carotenóides, os solventes mais adequados para a etapa de extração são os solventes orgânicos miscíveis em água, tais como acetona, etanol ou metanol (Davies, 1976).

Além destes, álcool isopropílico, misturas de hexana ou éter de petróleo e acetona em diversas proporções, mistura de éter de petróleo e isopropanol (1:3) e mistura de dicloroetano e metanol (1:1) também já foram empregados.

Edwards e Lee (1986) relataram que as diferenças encontradas nos conteúdos de carotenóides totais, bem como de carotenos, carotenóides monohidroxilados e polihidroxilados de amostras de cenoura fresca extraídas com acetona e com metanol, não foram significativas. Para amostras de ervilhas frescas, resultados semelhantes foram relatados com exceção do conteúdo de carotenos, que foi significativamente maior nas amostras extraídas com metanol.

Com a introdução do CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para a separação de carotenóides, o tetrahidrofurano também passou a ser utilizado. De acordo com Khachik et al. (1986), este é o mais adequado para extração dos pigmentos de vegetais, não só pela facilidade com que solubilizam os carotenóides e clorofilas, mas também pelo seu poder de desnaturar as

proteínas complexadas com os carotenóides, prevenindo a formação de emulsão. Porém, na extração de carotenóides e clorofilas de vegetais verdes, os autores não observaram nenhuma diferença significativa entre as composições quali e quantitativa de amostras extraídas com tetrahidrofurano, mistura de éter de petróleo e acetona ou mistura de éter etílico e metanol.

Com o objetivo de prevenir a perda de carotenóides por oxidação durante as análises, a adição de agentes antioxidantes é recomendada por Davies (1976) e tem sido utilizada por alguns pesquisadores (Gross et al., 1971; Reeder e Park, 1975; Noga e Lenz, 1983, Speek et al., 1986). O efeito da adição de pirogalol no conteúdo de carotenóides de amostras de ervilhas frescas extraídas com acetona foi avaliado por Edwards e Lee (1986). Um aumento significativo de 3,23 para 15,82 µg/g no conteúdo total de carotenos foi relatado, mas estranhamente, o conteúdo de β -caroteno não foi determinado e nenhuma diferença foi detectada nos outros carotenos como consequência da presença de pirogalol.

De acordo com Quackenbush e Smallidge (1986) a adição de antioxidantes deve ser feita com cautela, pois a maioria das frutas e vegetais contém antioxidantes naturais e a presença de antioxidantes em quantidades excessivas podem promover a autooxidação dos carotenóides.

O uso de agentes neutralizantes na etapa de extração recomendada para neutralizar os ácidos que podem ser liberados durante a trituração da amostra, faz parte do método da AOAC e já

foi utilizado por vários autores, em laranja (Curl, 1962; Stewart e Wheaton, 1973; Stewart, 1977a e Noga e Lenz, 1983), em caqui (Curl, 1960 e Philip e Chen, 1988), em frutas e vegetais (Bushway e Wilson, 1982; Bushway, 1985 e Bureau e Bushway, 1986) e em vegetais verdes (Khachik et al., 1986). Por outro lado, Schwartz e Patroni-Killam (1985) não detectaram a presença de isômeros *cis* em soluções de β -caroteno em éter de petróleo incubados com solução tampão na faixa de pH de 1 a 7, indicando que a acidez dos vegetais não causava isomerização deste carotenóide.

2.1.2. Saponificação

A saponificação é realizada com o objetivo de hidrolisar os ésteres de carotenóis e remover as clorofilas e lipídeos indesejáveis, que podem interferir na separação cromatográfica dos carotenóides.

A técnica consiste basicamente de adição de uma solução de KOH em metanol ou água ao extrato de pigmentos em éter de petróleo (ou hexana) ou etanol, respectivamente, seguida de permanência da mistura, em repouso, à temperatura ambiente ou em banho quente.

Apesar das diversas formas (diferentes concentrações de KOH, tempo e temperatura) empregadas, poucos estudos foram realizados para avaliar o mérito destes procedimentos, e opiniões

divergentes são citadas com relação à ocorrência ou não de perdas de carotenóides como consequência da saponificação.

Baranyai *et al.* (1982) observaram que a saponificação do extrato de páprica natural dissolvida em 50 ml de éter de petróleo, realizada com 5 ml de solução metanólica de KOH 30% à temperatura ambiente por 16 horas, não causou redução nos conteúdos de carotenóides.

Também Bushway e Wilson (1982) não encontraram diferenças nos conteúdos de α - e β -caroteno entre amostras saponificadas e não saponificadas (condições não especificadas) de cenoura, arandos, batata e "fiddlehead greens".

Schwartz e Patroni-Killam (1985) num estudo sobre detecção de isômeros *cis-trans* de α - e β -caroteno através de CLAE, avaliaram a influência da saponificação realizada com adição de 12,5 ml de solução saturada de KOH em metanol, à amostra dissolvida em 50 ml de hexana, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Nenhuma diferença no número de isômeros foi detectada pelos autores.

Ao contrário desses autores, Khachik *et al.* (1986) encontraram perdas significativas nos conteúdos de carotenóides de brócoli, durante a saponificação do extrato etéreo dos pigmentos com solução metanólica de KOH 30%, durante 3 horas à temperatura ambiente. As perdas observadas foram de 6% de β -caroteno e *cis*- β -caroteno, 37% de luteína, 70% de epoxi-luteína, 56% de violaxantina e 84% de neoxantina.

A ineficiência da saponificação à frio por uma noite para hidrolisar os carotenóides esterificados é citada por Davies (1976), baseando-se nos trabalhos realizados por Quackenbush e Miller (1972) e Quackenbush (1973). No entanto, o procedimento erroneamente chamado de "saponificação à frio por uma noite" por Quackenbush op. cit. envolve na verdade extração com solvente hexana-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7) por uma noite e saponificação por apenas 1 hora.

2.1.3. Separação cromatográfica

Os métodos para determinação de carotenóides podem ser divididos, segundo a técnica de separação, basicamente em 3 tipos: os que utilizam cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna aberta (CCA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.1.3.1. Cromatografia em camada delgada

Apesar de ter sido muito utilizada para separação de carotenóides de microrganismos e algas (Taylor, 1983), a cromatografia em camada delgada (CCD) foi pouco utilizada para análise quantitativa de frutas e vegetais.

Vários adsorventes podem ser utilizados, sendo os mais comuns sílica gel, MgO , Al_2O_3 e $Ca(OH)_2$ ou misturas destes. Para o desenvolvimento dos cromatogramas já foram usados éter de petróleo ou hexana puros ou combinados com éter etílico, benzeno ou acetona, além de outros solventes mais polares como os álcoois. A escolha do sistema adequado de adsorvente-solvente depende do tipo de carotenóides que estão sendo separados.

Em 1971, Gross et al. conseguiram isolar mais de 50 carotenóides de laranja através de CCD após uma separação preliminar em coluna de MgO :hiflosupercel (1:1). Para isto, foram utilizadas combinações de 4 fases estacionárias ($Ca(OH)_2$ -sílica gel G, 6:1; $Ca(OH)_2$ - MgO , 1:1; Al_2O_3 e sílica gel G) com 8 fases móveis (éter de petróleo; 2% de benzeno em éter de petróleo; 3, 5, 20 e 40% de acetona em éter de petróleo; éter de petróleo:acetato de etila:isopropanol, 95:10:5; e cloreto de metila:acetato de etila, 80:20. Posteriormente, os mesmos autores isolaram 26 carotenóides da polpa de abacate (1972) e num estudo sobre carotenóides de polpa, casca e folha de abacate, conseguiram isolar 29 componentes (1973).

Utilizando placa de celulose, Rahman e Buckle (1980) separaram 25 carotenóides de pimentão no estágio maduro. Os solventes empregados foram misturas de acetona e n-propanol ou benzeno, acetona e clorofórmio em éter de petróleo, n-propanol em hexana.

Apesar de ser muito útil para identificação,

especialmente no acompanhamento de reações químicas dos carotenóides (Taylor, 1983), a CCD tem sido utilizada apenas como último recurso para separação de misturas não conseguida por outras técnicas. Em análise quantitativa seu uso é limitado, devido à maior possibilidade de degradação dos carotenóides numa superfície grande e exposta. Além disso, a aplicação da amostra e a remoção dos componentes isolados em CCD são operações trabalhosas e difíceis de serem realizadas quantitativamente.

2.1.3.2. Cromatografia em coluna aberta

Para determinação quantitativa de carotenóides, a técnica mais utilizada tem sido a cromatografia em coluna aberta (CCA).

As vantagens da CCA em relação à CCD são: 1- os carotenóides ficam menos expostos à luz e oxigênio, 2- o tamanho da amostra e número dos carotenóides separados podem ser variados e 3- as frações são coletadas separadamente à medida em que saem da coluna.

Como em CCD vários adsorventes e solventes podem ser utilizados. De acordo com Davies (1976), os carotenos são melhor separados em coluna de hidróxido de cálcio ou alumina (Al_2O_3) mais ativa, enquanto os carotenóides monohidroxilados são bem resolvidos em alumina menos ativa. Carbonato de cálcio e óxido de magnésio são adequados para separação de carotenóides de polaridade

intermediária, enquanto xantofilas mais polares requerem adsorventes menos ativos como a celulose. Para os carotenóides instáveis em meio ácido (como os 5,6-monoepoxidados) o uso de alumina neutra é mais recomendado e adsorventes ácidos como sílica gel devem ser usados com cautela.

De acordo com Simpson et al. (1985), foi observado por Tanaka et al. (1981) que dos adsorventes óxido de magnésio, alumina, microcel C e sílica gel, o óxido de magnésio foi o que causou menor alteração no espectro de absorção do β -caroteno, enquanto a sílica gel causou o maior deslocamento hipsocrômico.

Hidroxilação na posição 4 do anel β -ionona foi relatado por Rodriguez et al. (1976b) quando β -caroteno foi exposto ao microcel C (23, 40 e 65% de conversão com 10, 20 e 30 g de adsorvente, respectivamente). Perdas de β -caroteno de 36, 32, 30, 20, 19 e 1 % quando este foi exposto por 30 minutos à 20 g de alumina, "kieselguhr", sílica gel, MgO, celite e hiflosupercel, respectivamente, também foram reportadas pelos mesmos autores.

A maioria dos pesquisadores que empregaram CCA para separação dos carotenóides utilizou como adsorvente mistura ativada ou não de MgO:hiflosupercel na proporção de 1:1 ou 1:2 ou alumina neutra. O único autor que constatou degradação significativa de carotenóides em coluna de MgO:hiflosupercel (1:1) ativado foi Rouchaud et al. (1984).

Como fase móvel os solventes comumente utilizados são éter de petróleo ou hexana e gradiente de éter etílico ou acetona

em éter de petróleo. De acordo com Davies (1976), clorofórmio tem sido evitado devido ao perigo de expor os carotenóides à traços de ácido.

2.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

Nos últimos anos, a utilização da CLAE para separação de carotenóides vem sendo bastante pesquisada, com ênfase para as provitaminas. Até o presente momento, no entanto, nenhum trabalho com composição completa de carotenóides de frutas ou vegetais foi reportado.

Separação de carotenóides de produtos de páprica e de casca de laranja, conseguida em uma única eluição, foi reportada por Baranyai et al. (1982) e Noga e Lenz (1983), respectivamente. Baranyai et al. utilizaram coluna de fase reversa C_{18} (Nucleosil 10) e mistura de acetona:água (100:40 e 100:5) como fase móvel, enquanto a combinação escolhida por Noga e Lenz foi 2 colunas de LiChrosorb RP-18 ligadas em série e eluição com gradiente de metanol:água (9:1) em acetona. Porém, os autores não conseguiram identificar todos os componentes e as concentrações foram calculadas baseando-se na porcentagem das áreas dos picos.

2.1.4. Identificação

Embora a importância da etapa de separação seja indiscutível, a mesma atenção e cuidado devem ser dispensados na identificação dos pigmentos para se determinar corretamente a composição de carotenóides.

A identificação pode ser conseguida pela análise ou uso dos seguintes parâmetros: afinidade de adsorção em coluna ou camada delgada, espectro de absorção, reações químicas específicas, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e espectroscopia infra-vermelho (Davies, 1976).

Para a elucidação estrutural de carotenóides desconhecidos, os analistas devem recorrer a todo o arsenal de técnicas analíticas, particularmente à espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. A confirmação da identidade de uma provitamina conhecida, no entanto, pode ser obtida pela combinação criteriosa dos parâmetros mais tradicionais, como o comportamento cromatográfico, espectro de absorção e reações químicas específicas (Rodriguez-Amaya, 1989).

2.1.5. Quantificação

O método padrão para determinação quantitativa de carotenóides é por espectrofotometria. As absorbâncias das soluções

dos pigmentos isolados contidos em volumes de solvente conhecidos são medidas no comprimento de onda de absorção máxima e as concentrações são calculadas utilizando valores de absortividade específicos para cada carotenóide.

Esta técnica, facilmente aplicável e muito utilizada nos métodos que fazem uso da CCA, torna-se limitada apenas nos raros casos de quantificação de carotenóides cujos valores de absortividade ainda não se encontram tabelados.

Nos métodos que utilizam CLAE, a quantificação tem sido feita por normalização, calibração com padrão externo ou interno. As diferenças no valor de absortividade e comprimento de onda de absorção máximo dos carotenóides e a falta de estabilidade e disponibilidade de padrões ainda representam problemas para o emprego desta técnica.

2.2. Métodos analíticos para determinação de provitamina A

Dentre as várias funções desempenhadas pelos carotenóides, a sua atividade provitáminica A é de grande importância especialmente para os países em desenvolvimento, onde a deficiência de vitamina A é considerada um dos problemas nutricionais mais sérios.

Para atuar como precursor de vitamina A, o carotenóide deve ser dotado de um anel β -ionona não substituído com cadeia

lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos. Dessa forma, torna-se evidente que nem todos carotenóides atuam como precursores de vitamina A.

Portanto, para se avaliar o valor de vitamina A de um alimento não é necessário se determinar a composição completa de carotenóides, mas apenas separar e quantificar os que apresentam atividade vitamínica. Deve-se lembrar no entanto, que para se obter uma determinação correta do valor de vitamina A, o método analítico deve possuir três requisitos: 1- separar os carotenóides inativos interferentes, 2- separar os carotenóides ativos entre si e 3- separar os isômeros *cis* dos *trans*.

Inicialmente, os procedimentos para determinação do valor de vitamina A baseavam-se no conteúdo total de carotenóides calculado através da absorção no comprimento de onda do β -caroteno.

Posteriormente, os valores passaram a ser calculados baseando-se na absorção de uma fração chamada "caroteno total", como nos métodos da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) e da COST (European Cooperation Scientific and Technological Research).

Considerando que nem todos carotenóides apresentam atividade vitamínica e que os ativos, além de possuírem atividades diferentes, podem absorver em comprimento de onda diferente do β -caroteno, é evidente que estes métodos podem superestimar ou subestimar o valor de vitamina A.

No Brasil, o método descrito por Rodriguez et al. (1976a) tem sido aproveitado para separar e quantificar todas as provitaminas e o cálculo do valor de vitamina A é feita considerando-se a atividade de cada uma delas.

Nos últimos anos, os pesquisadores tem se empenhado em desenvolver métodos que aproveitem o potencial da CLAE. No entanto, esses métodos ainda não conseguem separar todos os carotenóides provitamínicos.

2.2.1. Método da AOAC

O método 43.014 da AOAC (1984) para determinação de carotenos em vegetais frescos e silagens (descrito com detalhes no item 3.3.1.) é um dos métodos mais empregados para determinação do valor de vitamina A de amostras alimentícias. Embora vantajoso pela sua relativa simplicidade, tem sido citado como inadequado por vários autores (Reeder e Park, 1975; Simpson e Chichester, 1981; Cecchi e Rodriguez-Amaya, 1981a; Rodriguez-Amaya, 1985; Simpson e Tsou, 1986, Quackenbush e Smallidge, 1986). Em 1977, Gebhardt et al. compararam os valores de vitamina A de pêssago determinados pelo método da AOAC e por um método envolvendo separação em coluna empacotada com MgO:hiflosupercel (1:3) e

depois com $Mg(OH)_2 : Ca(OH)_2$ (1:6) utilizando gradiente de acetona em éter de petróleo. Na separação por gradiente de solvente em coluna empacotada com $Mg(OH)_2 : Ca(OH)_2$ (1:6), observaram que 10% de acetona em éter de petróleo eluía além do β -caroteno, a β -criptoxantina e outros carotenóides polihidroxilados, concluindo que o mesmo deveria acontecer no método da AOAC. O valor de vitamina A encontrado foi de 2.983 UI/100g pelo método da AOAC e de apenas 535 UI/100g pelo método utilizando separação com gradiente de solvente.

Zakaria et al. (1979) obtiveram pelo método da AOAC, um valor de vitamina A de tomate quinze vezes maior que o calculado considerando apenas o β -caroteno determinado por CLAE.

Já Bushway e Wilson (1982) compararam o método da AOAC com um método utilizando CLAE que quantificava apenas o α e β -caroteno. Observaram que os valores de vitamina A pelo método da AOAC foram maiores para todos os produtos analisados (23.338 vs 18.078 UI/100g para cenoura, 96 vs 12 UI/100g para batata, 8.835 vs 3.969 UI/100g para "fiddlehead greens" e 283 vs 24 UI/100g para arandos). Os autores alegaram que a superestimação ocorria porque na técnica por coluna aberta, carotenóides sem atividade provitamina A como o licopeno e carotenóides monohidroxilados, também eram eluídos da coluna e quantificados, além do método da AOAC não distinguirem o α -do β -caroteno, que possui apenas 53% de atividade vitamínica A.

2.2.2. Método da COST

No método recomendado pela COST (Brubacker et al., 1985), os carotenos são recolhidos numa única fração, calculados como β -caroteno e expressos em mg caroteno/100g de amostra.

O método para determinação do valor de vitamina A de frutas e vegetais envolve a extração dos pigmentos de 10 g de amostra fresca com três porções de 50 ml de acetona. O extrato é recolhido em um balão volumétrico de 200 ml e o volume completado com acetona.

Uma aliquota de 20 ml é colocada em um funil de separação e saponificada com 0,5 ml de KOH 40% em metanol por 30 minutos, em repouso e a temperatura ambiente. Após adição de 30 a 40 ml de hexana ou éter de petróleo, a mistura é lavada com 3 porções de 100 ml de água destilada. O volume do extrato etéreo é elevado a 100 ml e uma aliquota é evaporada até a secura sob vácuo à 50°C (evaporador rotativo). O residuo é novamente evaporado com etanol para remoção de água residual e depois dissolvido com 3 a 5 ml de hexana ou éter de petróleo obtendo assim o extrato concentrado.

O extrato concentrado é aplicado numa coluna empacotada com Al_2O_3 desativada e a fração de carotenos é eluída sem sucção com hexana ou éter de petróleo. As xantofilas devem permanecer no topo da coluna.

A quantificação é feita à partir da absorbância a 450 nm

utilizando-se o valor de 2.590 (hexana) ou 2.600 (éter de petróleo) para $A_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Pelo fato de ser um método recente, não existem ainda na literatura trabalhos de avaliação do mesmo. Porém, este método não considera as provitaminas além do β -caroteno, assim, também pode levar a valores incorretos.

2.2.3. Métodos que empregam o CLAE

Muitos métodos por CLAE tem sido reportados na literatura, alegando como vantagens: velocidade, simplicidade, reprodutibilidade, menor exposição à oxigênio, luz, adsorvente e solvente e eficiência de separação.

A maioria dos métodos utilizam coluna de fase reversa C_{18} e as fases móveis comuns são combinações de acetronitrila, clorofórmio, diclorometano, tetrahydrofurano, metanol e hexana usadas isocraticamente.

Uma revisão minuciosa reunindo todos os trabalhos publicados sobre determinação quantitativa de provitamina A por CLAE foi feita por Rodriguez-Amaya (1989). Embora reconhecendo o grande potencial desta técnica, a revisão demonstra que os métodos existentes não conseguem separar todas as provitaminas, os resultados quantitativos são incoerentes e as etapas de preparo de amostra, identificação e quantificação necessitam aprimoramento.

2.3. Carotenóides de mamão

Apesar do mamão ser muito consumido tanto no Brasil quanto no exterior, poucos estudos foram realizados com relação a sua composição em carotenóides.

De acordo com o relato de Subbarayan e Cama (1964), Yamamoto e Tin realizaram em 1933 o primeiro trabalho sobre carotenóides de mamão e isolaram um carotenóide ao qual chamaram de caricaxantina. Mais tarde, em 1943, Karrer e Schlientz mostraram que a caricaxantina se tratava da criptoxantina. Em 1949, Sadama e Ahmed observaram a presença de zeaxantina, criptoxantina, β -caroteno, neo- β -caroteno B e neo- β -caroteno U. Contudo, a maioria dos carotenóides não foi identificada.

Mamões do tipo amarelo, variedade Bangalore da Índia foram analisados por Subbarayan e Cama (1964). O método empregado consistiu basicamente de extração com etanol, acetona e mistura de éter de petróleo-éter etílico (1:1), saponificação sob N_2 com solução metanólica de KOH 10% a 60° C por 30 minutos seguido de permanência por 1 noite à temperatura ambiente e separação dos componentes por cromatografia em coluna empacotada com MgO:hiflo-supercel (1:1) e em coluna de MgO:hiflosupercel (3:2) ou Al_2O_3 desativado quando necessário. Os carotenóides foram identificados pela análise do comportamento cromatográfico, coeficiente de partição, espectro de absorção e reações químicas específicas e suas concentrações foram apresentadas como porcentagem do total.

Os autores encontraram 19 carotenóides (3 não identificados), sendo o pigmento principal a β -criptoxantina, representando 48% de um total de 1,38 mg/100 g de polpa fresca. Os autores relataram também a presença do β -caroteno e criptoflavina em quantidades consideráveis (29,5 e 12,8% do total, respectivamente) e um grande número de derivados epoxidados em concentrações muito pequenas (Tabela 1).

Yamamoto (1964) determinou a composição de carotenóides de dois tipos de mamão, amarelo e vermelho, cultivados no Havai. O método empregado envolveu extração com quatro porções de acetona e uma de metanol, transferência para éter de petróleo, saponificação com solução metanólica de KOH 25% por 1 hora e separação dos pigmentos em coluna de MgO:hiflosupercel (1:2) utilizando gradiente de acetona em éter de petróleo (0 a 15%) para eluição das frações. A identificação foi feita da mesma forma que Subbarayan e Cama e a composição quantitativa também foi apresentada como porcentagem do total.

O conteúdo total de carotenóides foi de 3,7 mg/100g no tipo amarelo, sendo a β -criptoxantina o pigmento principal (38,9% do total), enquanto no tipo vermelho o licopeno foi responsável por 63,5% de um total de 4,2 mg/100g. A composição de carotenóides para o tipo amarelo e vermelho era constituída respectivamente de: 4,8 e 4,8 % de β -caroteno, 24,8 e 5,9 % de γ -caroteno, 15,6 e 4,4 % de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, 38,9 e 19,2 de β -criptoxantina, 0,0 e 63,5 % de licopeno e 15,9 e 2,2 % de mistura não resolvida.

TABELA 1: Composição de carotenóides de mamão "Bangalore".

CAROTENÓIDE	% do TOTAL ¹
Carotenos	
fitoeno	0,13
fitoflueno	0,06
β -caroteno	29,56
<u>cis</u> - β -caroteno	0,29
pigmento-x	0,09
γ -caroteno	2,86
ϵ -caroteno	0,12
Oxicarotenóides	
5,6-monoepoxi- β -caroteno	0,18
mutatocromo	0,10
aurocromo	0,12
β -criptoxantina	48,16
criptoflavina	12,85
violaxantina	3,42
<u>cis</u> -violaxantina	0,13
não identificado-400	0,43
não identificado-200	1,79
anteraxantina	0,13
crisantemaxantina	0,76
neoxantina	0,17

¹Conteúdo total de carotenóides de 1,38 mg/100g de polpa fresca.

Referência: Sulbarayan e Cama (1964).

Philip e Chen (1988) determinaram por CLAE a composição de carotenóides livres e esterificados de mamão (variedade não especificada) (Tabela 2). Os pigmentos foram extraídos com metanol com adição de $MgCO_3$ e mistura de acetona-éter de petróleo (80:20). A fase etérea foi lavada com água, concentrada e o extrato foi separado primeiramente em coluna de Al_2O_3 (atividade IV). As três frações então obtidas foram separadas por CLAE usando coluna de fase reversa C_{18} e metanol seguido de gradiente convexo de 50:50 de metanol-acetonitrila e depois gradiente linear de acetato de etila 100%. As frações foram identificadas através do espectro de absorção, testes químicos, propriedades de adsorção e tempo de retenção. Para a quantificação foi usado Sudan I como padrão interno e as concentrações foram calculadas como equivalente de β -caroteno. O conteúdo total de carotenóides reportado foi de 25 $\mu g/g$ e os pigmentos principais encontrados foram β -caroteno, β -criptoxantina, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e ésteres da β -criptoxantina, anteraxantina e 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina correspondendo a 2,8; 4,3; 4,9; 25,6; 7,5 e 27,4 % do total, respectivamente.

TABELA 2: Composição de carotenóides de mamão determinada por CLAE.

CAROTENÓIDE	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/g}$) ¹
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	1,23
β -criptoxantina	1,07
não identificado I	0,32
não identificado II	0,45
dicrapato de anteraxantina	0,42
laurato-caprato de anteraxantina	0,67
caprilato de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	0,80
dicrapato de anteraxantina	0,78
não identificado III	0,82
caprato de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	0,78
caprilato de β -criptoxantina +	
miristato-laurato de anteraxantina	1,44
β -caroteno	0,71
laurato de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	2,60
caprato de β -criptoxantina	1,93
miristato de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	1,44
laurato de β -criptoxantina	3,20
palmitato de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	1,23
miristato de β -criptoxantina	0,90
palmitato de β -criptoxantina	0,38

¹Concentração aproximada reportada como equivalente de β -caroteno.

Referência: Philip e Chen (1988).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Amostragem e preparo de amostras

3.1.1. Amostras alimentícias

A aquisição das amostras de couve foi realizada ao acaso em quitandas de Campinas. Cada amostra foi preparada a partir de um maço de couve, cujas folhas foram finamente picadas e misturadas antes da retirada da amostra analítica.

Para a comparação de cultivares, mamões (*Carica papaya* L) maduros foram adquiridos em mercados de Campinas, sem considerar a origem dos frutos. Para verificação do efeito geográfico, mamões maduros cultivar Formosa foram adquiridos, na mesma época do ano, de dois postos da Ceasa de Campinas, sendo um fornecedor de mamões do estado de São Paulo e outro da Bahia. Em ambos os casos, cada amostra foi preparada utilizando-se 3 ou 5 frutos colhidos ao acaso (3 para cultivares Comum, Formosa e Tailândia e 5 para Solo). Os frutos foram quarteados e de duas partes opostas, as cascas e sementes foram retiradas e as polpas foram juntadas e homogeneizadas no liquificador.

Os cajás (*Spondias lutea* L) foram obtidos em feiras de Recife (Pernambuco) no estágio maduro e transportados para Campi-

nas por via aérea. Para determinação da composição de carotenóides da polpa com casca, foram utilizadas as cascas e polpas de 5 a 7 frutos homogeneizadas no liquidificador. Para a composição da polpa sem casca, 20 frutos foram descascados e as polpas foram juntadas e homogeneizadas no liquidificador.

3.1.2. Carotenóides sintéticos

Para a avaliação da etapa de saponificação, além das amostras alimentícias, também foram utilizados dois carotenóides sintéticos, β -caroteno e β -apo-8'-carotenal, fornecidos pela Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A.. Considerando a facilidade com que os carotenóides se degradam, os padrões foram dissolvidos em éter de petróleo e purificados por cromatografia em coluna empacotada com mistura de MgO ativado (110°C por 4 horas) e kieflosupercel na proporção de 1:1 e depois em coluna empacotada com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

3.2. Determinação de carotenóides segundo método descrito por Rodriguez et al. (1976a)

Tendo em vista a grande susceptibilidade dos carotenóides à degradação, as análises foram conduzidas em local afastado da

luz solar, sem luz artificial e protegendo-se as colunas e recipientes contendo soluções de carotenóides com papel alumínio. As análises também foram executadas dentro do mínimo de tempo possível (máximo de 7 dias).

A extração dos pigmentos foi realizada agitando-se a amostra (5 g de couve, 20 g de mamão e 20 g de cajá) com acetona resfriada e hiflosupercel (cerca de 10 g) em um liquidificador com copo de aço inoxidável por 2 minutos, seguido de filtração em funil de Buchner com vácuo. A extração e filtração foram repetidas até que o residuo se tornasse incolor.

Os pigmentos foram transferidos para éter de petróleo adicionando-se pequenas porções do extrato num funil de separação contendo cerca de 150 ml de éter de petróleo. Cada adição foi seguida de lavagem com água destilada, descartando-se a camada inferior após a separação das fases. Realizada a transferência total do extrato, os pigmentos em éter de petróleo foram lavados com 5 porções de água destilada para assegurar a remoção completa da acetona.

A saponificação foi feita adicionando-se igual volume de solução metanólica de KOH 10 % à solução etérea de pigmentos e deixando-se a mistura em repouso no escuro, à temperatura ambiente. Após uma noite (14 horas) a mistura foi lavada com água destilada num funil de separação até remoção completa do álcali. Sulfato de sódio anidro foi então adicionado para a retirada da água residual. No caso dos pigmentos da couve, cuja transferência

da fase metanol-água para éter de petróleo se mostrou difícil, os pigmentos remanescentes na fase metanol-água foram transferidos para éter etílico.

A solução de carotenóides foi concentrada em evaporador rotativo com vácuo até cerca de 20 ml, tomando-se o cuidado de não ultrapassar 35°C para evitar degradação térmica dos pigmentos.

Para separação dos carotenóides foi utilizada uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, empacotada à vácuo com mistura de MgO ativado (110°C por 4 horas) e hiflosupercel na proporção de 1:1 ou MgO:hiflosupercel (1:2) até a altura de 13 cm. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (1 cm) foi adicionada no topo da coluna para reter eventual água residual do extrato. Mantendo o vácuo, a coluna foi molhada com éter de petróleo e após aplicação do extrato, as frações foram eluídas com gradientes de éter etílico em éter de petróleo (1, 2, 4 e 5%) e de acetona em éter de petróleo (2, 4, 8, 10, 15 e 20%), acetona pura e 10% de água em acetona.

As frações contendo acetona foram lavadas com água destilada em um funil de separação e recolhidas em erlenmeyer. Após adição de sulfato de sódio anidro, as frações foram concentradas ou diluídas à um volume adequado para leitura espectrofotométrica.

As frações que mostraram ser misturas quando cromatografadas em camada delgada, foram recromatografadas em coluna empacotada com óxido de alumínio neutro (atividade II-III).

Para separação dos isômeros *cis* as frações foram recro-

matografadas em colunas de 2 cm de diâmetro empacotadas com alumínio neutro (atividade II-III).

Os carotenóides foram identificados analisando-se em conjunto a ordem de eluição na coluna, espectros de absorção na região do visível, valores de Rf e reações químicas específicas.

Os espectros de absorção dos carotenóides foram registrados na faixa de comprimento de onda de 350 a 550 nm utilizando-se um espectrofotômetro de feixe duplo (Perkin Elmer modelo 356 ou Unicam modelo SP 8000) com registrador acoplado. Os picos de absorção máximo foram então comparados com valores tabelados (Davies, 1976).

Para determinação dos valores de Rf, os carotenóides isolados foram concentrados e cromatografados em placas de vidro com 0,25 mm de espessura de sílica gel ativada a 110° C por 2 horas, utilizando-se como fase móvel 3% de metanol em benzeno. Nessas condições os carotenos eluíram com a frente do solvente e os oxicarotenóides ficaram mais ou menos retidos de acordo com o número e tipo de grupos funcionais.

Após o desenvolvimento, a placa foi exposta a vapores de HCl por 3 a 5 minutos, para verificar a presença de carotenóides epoxidados. A presença destes foi detectada pela mudança da cor amarela ou laranja das manchas para azul ou verde. A presença de 1 ou 2 grupos 5,6-epóxido foi confirmada pela diminuição de 20 e 40 nm respectivamente dos máximos de absorção, 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 configuração cis ou trans, algumas gotas de solução etérea de iodo foram adicionadas ao pigmento em éter de petróleo. O espectro registrado após cinco minutos de exposição à luz, demonstrou no caso de carotenóides originalmente na forma trans, um deslocamento para comprimento de onda mais baixo devido a isomerização para a forma cis. Já para os cis carotenóides não se observou nenhuma mudança ou mudança para comprimento de onda maior.

Para constatar a presença de hidroxilas, utilizou-se a reação de acetilação. Esta técnica consistiu em juntar 0,2 ml de anidrido acético ao pigmento dissolvido em 2,0 ml de piridina e deixar a mistura por 21 horas no escuro à temperatura ambiente. O pigmento foi então transferido para éter de petróleo e submetido novamente à cromatografia em camada delgada. A reação positiva foi caracterizada por aumento no valor de Rf.

Finalmente a presença de hidroxila alílica foi confirmada por reação de metilação. Ao pigmento dissolvido em metanol, adicionou-se HCl 2 N e após 3 horas no escuro e à temperatura ambiente, o pigmento foi transferido para éter de petróleo e recromatografado em camada delgada. A reação positiva caracterizou-se por um aumento do valor de Rf.

A quantificação de cada carotenóide foi feita aplicando-se a Lei de Beer, a partir da absorbância máxima e dos valores de absortividade tabelados por Davies (1976). Os resultados foram expressos em µg de carotenóide por g de amostra.

3.3. Determinação do valor de vitamina A

3.3.1. Determinação do valor de vitamina A segundo método da AOAC

Os pigmentos da amostra (5 g de couve e 20 g de mamão) foram extraídos com 100 ml de solução de acetona-hexana (4:6) e 0,1g de $MgCO_3$, em liquidificador com copo de aço inoxidável, agitando-se durante 5 minutos. Após a filtração em um funil de Buchner com vácuo, o resíduo foi lavado com duas porções de 25 ml de acetona e uma porção de hexana.

O extrato combinado foi então transferido para um funil de separação e lavado com 5 porções de 100 ml de água destilada, descartando-se a fase inferior após cada lavagem. A fase superior (hexana) foi recolhida em um balão volumétrico de 100 ml contendo 9 ml de acetona e o volume completado com hexana.

A solução de pigmentos foi então colocada, com sucção, em uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, empacotada à vácuo com mistura de MgO ativado:hiflosupercel (1:1) até a altura de 10 cm e com 1 cm de sulfato de sódio anidro no topo. A fração eluída com 50 ml de acetona-hexana (1:9) foi lavada com água, o volume completado a 100 ml com hexana e a absorvância lida a 436 nm.

O teor de carotenóides, expresso como β -caroteno, foi calculado utilizando-se o valor de 1960 para $A_{1\text{cm}}^{1\%}$.

3.3.2. Determinação do valor de vitamina A segundo método de Rodriguez et al. (1976a) simplificado

As etapas de extração, transferência para éter de petróleo, saponificação e concentração foram feitas de acordo com a determinação da composição completa de carotenóides (item 3.2.).

Para a separação dos carotenóides com atividade pró-vitáminica foi utilizada uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, empacotada à vácuo com mistura de MgO ativado e hiflosupercel na proporção de 1:1 até a altura de 10 cm. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada no topo da coluna para reter eventual água residual do extrato. Mantendo o vácuo, a coluna foi molhada com éter de petróleo e após aplicação do extrato, as frações foram eluídas com gradiente de acetona em éter de petróleo. Nessa coluna, o β -caroteno foi eluído com 2% de acetona, o 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina com 8% de acetona e a β -criptoxantina com 15% de acetona.

As frações foram lavadas com água destilada em um funil de separação e após adição de sulfato de sódio anidro, as frações foram concentradas ou diluídas à um volume adequado para a leitura espectrofotométrica.

A quantificação de cada carotenóide foi feita aplicando-se a Lei de Beer, a partir da absorbância máxima e dos valores de absortividade tabelados por Davies (1976).

O cálculo do valor de vitamina A foi feito a partir da

atividade vitamínica de cada carotenóide precursor, utilizando-se a relação proposta pelo National Academy of Science-National Research Council (NAS-NRC, 1980) : 1 Unidade Internacional (UI) equivalente a 0,6 µg de β-caroteno e 1,2 µg dos outros carotenóides precursores.

3.4. Avaliação da etapa de extração

Diferentes solventes (puros ou misturas) e adição de agentes antioxidantes e neutralizantes tem sido empregados na etapa de extração de carotenóides. Os procedimentos mais comumente encontrados na literatura foram avaliados utilizando-se couve como amostra.

Para a avaliação de eficiência do solvente, os carotenóides principais da couve foram quantificados pelo método descrito por Rodriguez et al. (1976a), utilizando na extração os seguintes solventes: acetona, metanol, hexana-acetona (60:40) e éter de petróleo-acetona (60:40).

Para a avaliação do efeito da adição de antioxidantes e neutralizantes, os carotenóides principais da couve foram quantificados pelo método descrito por Rodriguez et al. (1976a), utilizando acetona como solvente de extração com adição de: 0,1g de BHT (hidroxi butil tolueno), 0,5 g de pirogalol ou 0,1g de MgCO₃ (carbonato de magnésio). A quantidade de BHT adicionada foi o dobro da

utilizada por Reeder e Park (1975), a de pirogalol a mesma sugerida por Edwards e Lee (1986) e a de $MgCO_3$, aquela especificada pela AOAC (1984).

Nos dois casos, da amostra preparada conforme o item 3.1.1. foram retiradas 8 sub-amostras utilizando-se duas para cada solvente ou agente testado.

3.5. Avaliação da etapa de saponificação

Foram avaliados vários procedimentos de saponificação comumente empregados de acordo com a literatura. Como amostra foram utilizados dois carotenóides sintéticos (β -caroteno e β -apo-8'-carotenal) e duas amostras alimentícias (couve e mamão). Para os carotenóides sintéticos, da solução previamente purificada, tomou-se 5 ml para cada procedimento de saponificação testado. Para a couve e mamão, fez-se a extração de uma quantidade maior de amostra e 2 alíquotas do extrato foram utilizados para cada procedimento de saponificação testado.

Exceto a etapa de saponificação, a determinação de carotenóides foi realizada de acordo com o método descrito por Rodriguez et al. (1976a).

Os procedimentos de saponificação testados foram:

I- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à temperatura ambiente.

Ao carotenóide dissolvido em 50 ml de éter de petróleo, foi adicionado igual volume de solução metanólica de KOH 10%. A mistura foi deixada em repouso durante uma noite (14 horas) no escuro e à temperatura ambiente.

II- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à quente.

Ao carotenóide dissolvido em 50 ml de éter de petróleo, foi adicionado igual volume de solução metanólica de KOH 10%. A mistura foi aquecida por 10 minutos, no escuro, em banho de vapor.

III- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à temperatura ambiente.

A solução de carotenóides, adicionou-se 50 ml de etanol e solução aquosa de KOH 60% (1 ml por 10 ml de solução). Após a remoção do éter de petróleo com nitrogênio, a mistura foi deixada por uma noite (14 horas) no escuro e à temperatura ambiente.

IV- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à quente.

A solução de carotenóides, adicionou-se 50 ml de etanol e solução aquosa de KOH 60% (1 ml por 10 ml de solução). Após a remoção do éter de petróleo com nitrogênio, a mistura foi aquecida por 10 minutos, no escuro, em banho em ebulição.

V- Saponificação segundo AOAC à temperatura ambiente.

Ao carotenóide contido em um balão volumétrico de 100 ml, procedeu-se a adição de 30 ml do solvente de extração hexana-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7) seguida de agitação por 1 minuto. Após 16 horas de repouso no escuro e à temperatura ambiente, foi adicionado 2 ml de solução metanólica de KOH 40%. Após agitação por 1 minuto, a mistura foi deixada 1 hora em repouso no escuro e à temperatura ambiente. Adicionou-se então, 30 ml de hexana e depois de 12 minutos de agitação, o volume foi completado com solução aquosa de Na_2SO_4 10%. Depois de 1 minuto de agitação vigorosa, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 1 hora.

VI- Saponificação segundo AOAC à quente.

Ao carotenóide contido em balão volumétrico de 100 ml, procedeu-se a adição de 30 ml do solvente de extração hexana-acetona-etanol-tolueno (10:7:6:7) seguida de agitação por 1 minuto. Em seguida adicionou-se 2 ml de solução metanólica de KOH 40%. A mistura foi agitada por 1 minuto, aquecida em banho à 56°C, resfriada e deixada por 1 hora em repouso no escuro e à temperatura ambiente. Adicionou-se então 30 ml de hexana e depois de 1 minuto de agitação, o volume foi completado com solução aquosa de Na_2SO_4 10%. Depois de 1 minuto de agitação vigorosa, a mistura foi

deixada em repouso no escuro, à temperatura ambiente por 1 hora.

3.6. Determinação da composição de carotenóides de mamão e cajá

As composições qualitativa e quantitativa do mamão e cajá foram determinadas, utilizando-se o método descrito por Rodriguez et al. (1976a).

No mamão, a diferença entre cultivares e efeito geográfico na mesma cultivar também foram investigados. Para cada região de cultivo e cada cultivar foram analisadas cinco amostras compostas, preparadas conforme item 3.1.1.

As cultivares de mamão analisadas foram aquelas comumente encontradas à disposição dos consumidores: Comum, Solo, Formosa e Tailândia .

Para o cajá , foram determinadas as composições do fruto nas duas formas em que são consumidas, polpa com casca e polpa sem casca. Para a polpa sem casca foi feita a determinação de uma só amostra e para a polpa com casca foram analisadas quatro amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do método analítico

4.1.1. Etapa de extração

A Tabela 3 apresenta os conteúdos de β -caroteno e luteína de amostras de couve extraídas com acetona, metanol e misturas de acetona-hexana e acetona-éter de petróleo. Os resultados mostraram ser a acetona o solvente de extração mais eficiente.

Em termos de β -caroteno, o conteúdo das amostras extraídas com acetona foram levemente superiores às demais. Contudo a diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada com amostras extraídas com mistura de acetona-hexana ou acetona-éter de petróleo. A mais baixa concentração de β -caroteno foi obtida nas amostras extraídas com metanol (73% do conteúdo das amostras extraídas com acetona).

Apesar de não possuir atividade vitamínica, a luteína foi também quantificada para avaliar o comportamento de um carotenóide polar. Neste caso, as amostras extraídas com acetona apresentaram teores significativamente maiores que as extraídas com mistura de acetona-hexana ou éter de petróleo. Assim como para o β -caroteno, o teor de luteína de amostras extraídas com metanol

TABELA 3: Avaliação da etapa de extração na determinação de carotenóides de couve.

SOLVENTES E AGENTES ADICIONADOS DURANTE A EXTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES ($\mu\text{g/g}$) ¹	
	β -CAROTENO	LUTEÍNA
Acetona	46,72 $\pm$ 0,11 a	51,49 $\pm$ 1,99 a
Hexana:acetona (60:40)	42,63 $\pm$ 0,20 a	35,57 $\pm$ 0,30 b
éter de petróleo:acetona (60:40)	43,16 $\pm$ 0,94 a	33,18 $\pm$ 0,34 b
Metanol	34,05 $\pm$ 3,20 b	5,84 $\pm$ 0,64 c
Acetona	43,21 $\pm$ 0,00 a	76,44 $\pm$ 0,63 a
Acetona + 0,10 g BHT	43,98 $\pm$ 0,00 a	76,78 $\pm$ 0,50 ac
Acetona + 0,05 g pirogalol	42,82 $\pm$ 0,54 a	81,69 $\pm$ 0,63 b
Acetona + 0,10 g MgCO ₃	42,05 $\pm$ 0,54 a	80,80 $\pm$ 1,89 bc

¹Média e desvio padrão de determinações em duplicata.

Para cada grupo, os valores da mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5%.

foi o menor (11% do conteúdo de amostras extraídas com acetona). No entanto, essa redução não parece ser causada apenas pela ineficiência do solvente, tendo em vista a grande dificuldade em transferir posteriormente os pigmentos do metanol para o éter de petróleo decorrente da maior tendência da luteína em permanecer na fase mais polar.

Estes resultados contrariam os dados reportados por Edwards e Lee (1986) que obtiveram um conteúdo de β -caroteno, para amostras de ervilha extraídas com metanol, significativamente maior que amostras extraídas com acetona (5,61 vs 2,18 $\mu\text{g/g}$). Por outro lado, observa-se que o teor de β -caroteno de amostras de cenoura extraídas com acetona foi bem maior que o teor de amostras extraídas com metanol (800,1 vs 752,1 $\mu\text{g/g}$), embora a diferença tenha sido considerada estatisticamente não significativa pelos autores. Aparentemente, a precisão do método utilizado pelos autores é bem menor que a do método utilizado neste estudo.

A adição de agentes antioxidantes e neutralizantes tem sido recomendada com o objetivo de prevenir a perda de carotenóides por oxidação e isomerização. Os resultados apresentados na Tabela 3 porém, mostram que em termos de β -caroteno, nenhuma diferença significativa ocorreu em consequência da adição desses agentes. No entanto, os teores de luteína, embora levemente, foram significativamente maiores para amostras extraídas com adição de pirogalol e MgCO_3 .

Pelo fato da luteína não apresentar atividade vitamini-

ca, não se verificou nenhuma vantagem no uso desses agentes para a determinação do valor de vitamina A de couve. Neste caso, esta prática acarreta apenas um acréscimo injustificável de custo e tempo na etapa de extração.

Cabe lembrar que neste estudo, as amostras foram analisadas logo após a sua chegada e as análises foram conduzidas dentro do mínimo de tempo possível, tomando-se ainda as precauções necessárias para proteger os pigmentos contra luz e altas temperaturas. Provavelmente esses agentes se tornem úteis se as amostras ou soluções forem estocadas por algum tempo antes ou durante as análises.

4.1.2. Etapa de saponificação

A saponificação sempre foi considerada o procedimento mais eficiente para remover lipídeos e clorofilas e para hidrolisar ésteres de carotenóides hidroxilados. Recentemente, no entanto, Khacik et al. (1986) alegaram perdas de carotenóides em brócoli durante a saponificação. Por outro lado, Bushway e Wilson (1982) não observaram qualquer diferença entre amostras saponificadas e não saponificadas. Os resultados encontrados neste estudo mostraram que a perda de carotenóides durante a saponificação depende das condições em que esta é conduzida e do carotenóide analisado.

4.1.2.1. Efeito da saponificação em carotenóides sintéticos

As perdas de β -apo-8'-carotenal em amostras submetidas a seis diferentes procedimentos de saponificação encontram-se na Tabela 4.

O procedimento I que envolve saponificação à temperatura ambiente com adição de igual volume de solução metanólica de KOH 10% ao pigmento dissolvido em éter de petróleo foi o que apresentou melhor retenção do carotenóide (0 a 3% de perda), enquanto os procedimentos V e VI que envolvem saponificação na presença de acetona causaram perda total do β -apo-8'-carotenal.

Comparando os procedimentos I e III conduzidos à temperatura ambiente com seus similares II e IV realizados à temperaturas mais elevadas notou-se que a saponificação à quente causou degradações maiores, 0-3% e 1-12% vs 18-29 e 46-60% de perdas, respectivamente.

Os resultados mostraram também um aumento nas perdas durante a saponificação de amostras dissolvidas em etanol (procedimentos III e IV) em relação à saponificação de amostras dissolvidas em éter de petróleo (procedimentos I e II). Aparentemente, este aumento se deve ao maior contato que ocorre entre o álcali e o carotenóide.

Na tentativa de compreender melhor as transformações que ocorrem durante a saponificação, os pigmentos foram posteriormente cromatografados em coluna empacotada com MgO ativado: hiflosupercel

TABELA 4: Perda (%) de β -apo-8'-carotenal durante a saponificação.

QUANTIDADE INICIAL (μ g)	PROCEDIMENTO DE SAPONIFICAÇÃO					
	I	II	III	IV	V	VI
354	3	18	12	60	100	100
443	1	19	1	46	100	100
538	0	29	4	49	100	100

I- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à temperatura ambiente

II- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à quente

III- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à temperatura ambiente

IV- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à quente

V- Saponificação segundo AOAC à temperatura ambiente

VI- Saponificação segundo AOAC à quente

(1:1) a fim de separar os epóxidos e em coluna de óxido de alumínio neutro para a separação dos isômeros cis.

Como pode ser observado através da Tabela 5, que apresenta os produtos formados durante a saponificação do β -apo-8'-carotenal, nenhum produto de degradação foi detectado nos procedimentos I e III que foram realizados à temperatura ambiente. No procedimento II, cuja temperatura de saponificação atinge 70° C houve formação do cis- β apo-8'-carotenal. Já no procedimento IV que envolve temperatura de até 85° C e maior contato entre pigmento e álcali, além dos isômeros cis foi detectada também a presença do 5,8-monoepoxi- β -apo-8'-carotenal em um dos ensaios.

Os procedimentos de saponificação V e VI especificados pela AOAC foram os que causaram as maiores transformações. No procedimento V realizado à temperatura ambiente na presença de acetona, o β -apo-8'-carotenal foi totalmente convertido em citranaxantina, confirmando os resultados de Stewart e Wheaton (1973), que observaram que a reticulataxantina e citranaxantina, anteriormente relatados como carotenóides naturais de citrus, eram na verdade artefatos formados a partir da β -citraurim e β -apo-8'-carotenal, durante a saponificação na presença de pequenas quantidades de acetona. Já na saponificação realizada à 56° C, procedimento VI, além da citranaxantina observou-se também a formação de cis-citranaxantina e de 5,8-monoepoxi- β -apo-8'-carotenal.

A identificação destes produtos de degradação foi baseada nos espectros de absorção característicos (Figura 1) e

TABELA 5: Carotenóides (μg) formados durante a saponificação de β -apo-8'-carotenal¹.

CAROTENÓIDE ²	PROCEDIMENTO DE SAPONIFICAÇÃO			
	II	IV	V	VI
<u>cis</u> - β -apo-8'-carotenal	11-82	44-66	-----	-----
5,8-monoepoxi- β -apo-8'-carotenal	-----	0-18	-----	8-30
citranaxantina	-----	-----	429-688	206-219
<u>cis</u> -citranaxantina	-----	-----	-----	58-205

¹Faixa obtida em 3 análises, a partir de 354-538 μg de β -apo-8'-carotenal.

²Estes carotenóides não foram detectados nos procedimentos I e III.

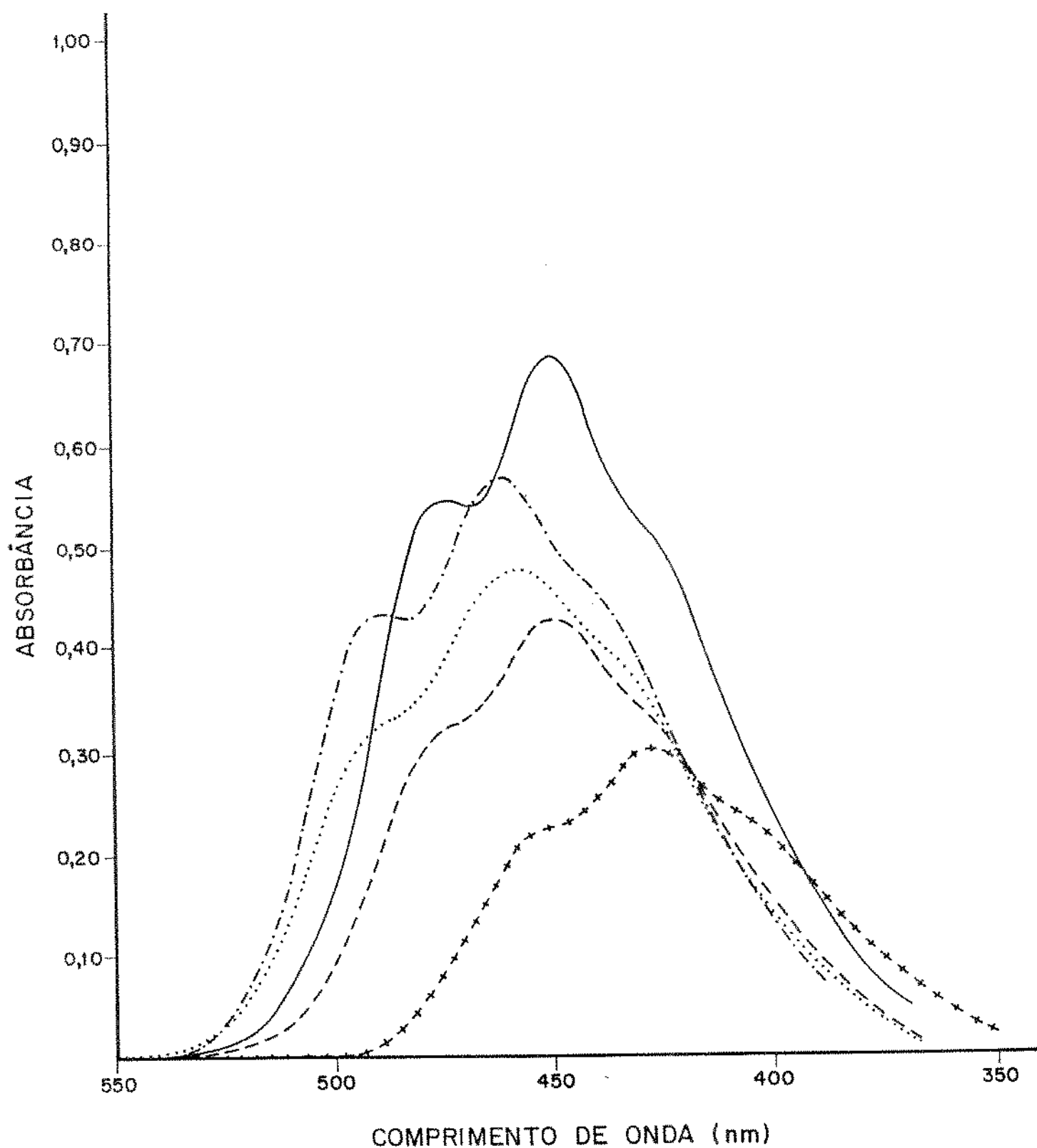


FIGURA 1: Espectros de absorção em éter de petróleo dos carotenóides formados durante a saponificação do β -apo-8'-carotenal (—•—): cis- β -apo-8'-carotenal(-----); 5,8-monoeпоxi- β -apo-8'-carotenal(++++)+); citranaxantina(— — — — —); cis-citranaxantina (.....).

reações químicas específicas. As configurações *cis* e *trans* foram confirmadas através de reação de fotoisomerização catalizada por solução etérea de iodo. A presença de um grupo epóxido 5,8 foi demonstrada pelo valor de Rf um pouco menor que do β -apo-8'-carotenal, mudança da cor da mancha de laranja para azul após exposição da placa de sílica à vapores de HCl e pelos máximos de absorção de 23 nm mais baixos que os do β -apo-8'-carotenal. A citranaxantina foi identificada baseando-se principalmente no espectro de absorção característico com máximo de absorção 11 nm mais alto que o do β -apo-8'-carotenal, decorrente da introdução de mais uma ligação dupla conjugada.

Em termos práticos, portanto, para amostras que contém apo-carotenóides, a acetona utilizada para extração deve ser completamente removida antes da saponificação para evitar a formação de adutos durante a análise.

O efeito da saponificação no β -caroteno pode ser avaliado pelos resultados da Tabela 6.

Também para o β -caroteno, o procedimento I foi aquele que apresentou melhor retenção do carotenóide (0 a 1% de perda) e o procedimento IV, o que causou maior grau de degradação (21 a 56% de perdas). Comparando com o β -apo-8'-carotenal, o β -caroteno aparentou ser menos susceptível à degradação durante a saponificação. Com relação ao efeito da temperatura e do contato entre pigmento e álcali, resultados semelhantes foram encontrados.

Seguindo as mesmas técnicas utilizadas para separar os

TABELA 6: Perda (%) de β -caroteno durante a saponificação.

QUANTIDADE INICIAL (μ g)	PROCEDIMENTO					
	I	II	III	IV	V	VI
513	0	14	6	21	20	16
521	1	4	11	56	12	16
548	0	16	17	31	17	25

I- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à temperatura ambiente

II- Saponificação com solução metanólica de KOH 10% à quente

III- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à temperatura ambiente

IV- Saponificação com solução aquosa de KOH 60% à quente

V- Saponificação segundo AOAC à temperatura ambiente

VI- Saponificação segundo AOAC à quente

produtos de degradação do β -apo-8'-carotenal, observou-se a formação do cis- β -caroteno em todos procedimentos testados com exceção do procedimento I. Além dos isômeros cis, as saponificações à quente causaram também a formação de epóxido 5,6 nos procedimentos II e IV e epóxido 5,8 no procedimento VI (Tabela 7).

As configurações cis e trans e a presença do grupo epóxido 5,8 foram confirmadas da mesma forma utilizada no β -apo-8'-carotenal. O 5,6-monoepoxi- β -caroteno foi identificado inicialmente através de seu espectro de absorção característico (Figura 2). A presença de um grupo epóxido 5,6 foi indicada pela mudança da coloração da mancha de amarela para azul após exposição da placa à vapores de HCl e pelo máximos de absorção 5 nm mais baixos que o do β -caroteno. A confirmação se deu pelo deslocamento hipsocrômico de 20 nm, após adição de HCl 0,1 N ao pigmento dissolvido em etanol, devido a transformação de 5,6 para 5,8 epóxido.

A certeza de que os produtos de degradação foram formados durante a saponificação advém dos fatos das amostras terem sido purificadas antes de serem submetidas aos tratamentos e também pela não detecção desses produtos nas sub-amostras não submetidas à saponificação, e naquelas sujeitas à saponificação pelo procedimento I, todas recromatografadas nas duas colunas e em camada delgada.

Além das perdas quantitativas durante a saponificação, os resultados também colocam em dúvida, relatos de presença de isômeros cis, bem como de derivados epoxidados, como constituintes

TABELA 7: Carotenóides (μg) formados durante a saponificação do β -caroteno¹.

CAROTENÓIDE ²	PROCEDIMENTO				
	II	III	IV	V	VI
<u>cis</u> - β -caroteno	----	3-32	39-49	5-13	36-37
5,6-monoepoxi- β -caroteno	4-16	----	0-45	----	-----
5,8-monoepoxi- β -caroteno	----	----	-----	----	8-9

¹Faixa obtida em 3 análises, a partir de 513-548 μg de β -caroteno.

²Estes carotenóides não foram encontrados no procedimento I.

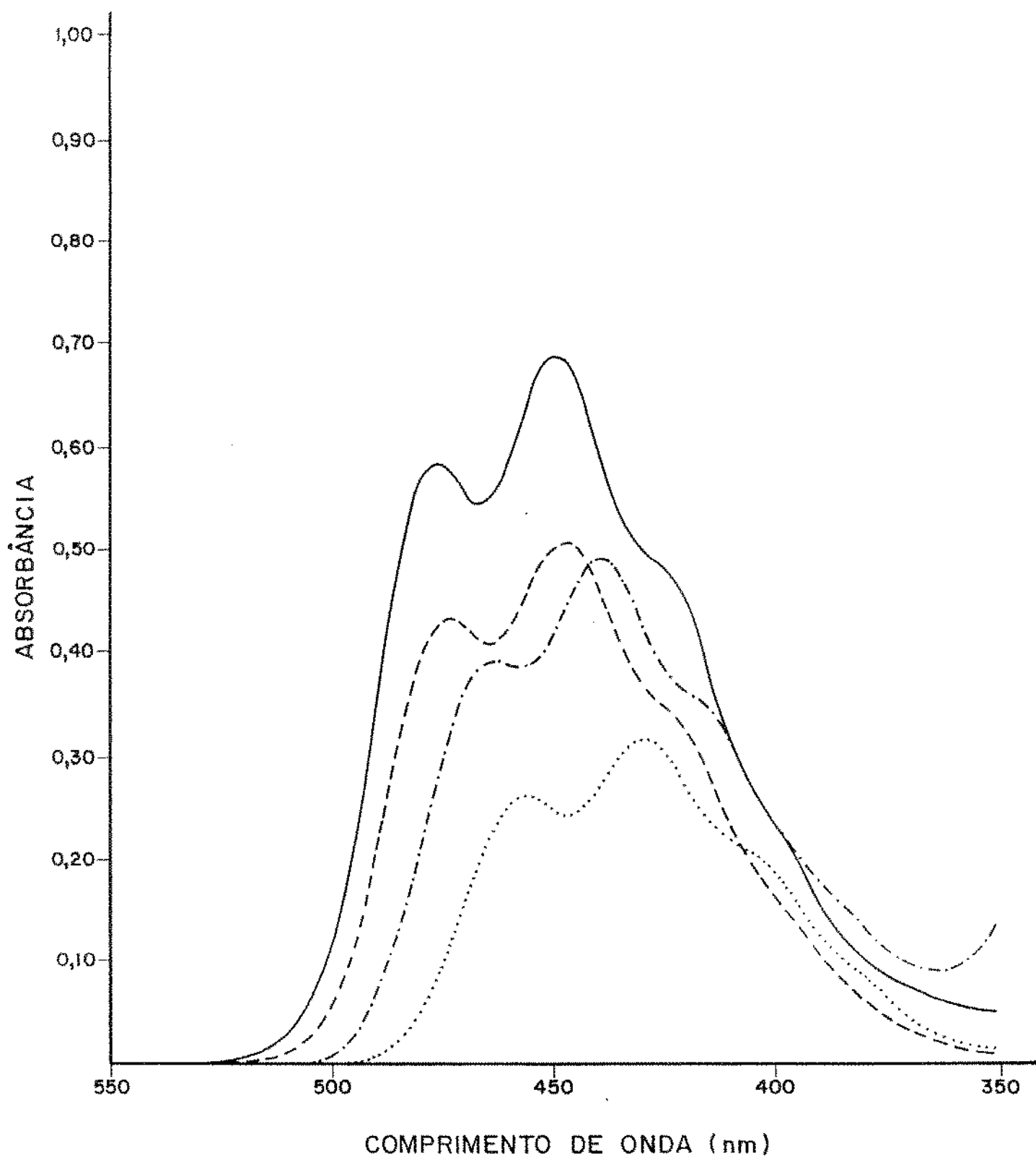


FIGURA 2: Espectros de absorção em éter de petróleo dos carotenóides formados durante a saponificação do β -caroteno(—): cis- β -caroteno(---); 5,6-monoepoxi- β -caroteno(-.-.-); 5,8-monoepoxi- β -caroteno(.....).

naturais de amostras sujeitas à saponificação utilizando os procedimentos de II a VI.

Observou-se também que nos procedimentos de saponificação à quente, o tempo e a temperatura devem ser rigorosamente controlados, pois uma pequena variação desses fatores causam diferenças significativas no conteúdo final dos carotenóides.

4.1.2.2. Efeito da saponificação nos carotenóides de couve e mamão

O efeito do procedimento I de saponificação, realizado com adição de igual volume de solução metanólica de KOH 10% por uma noite à temperatura ambiente, nos carotenóides principais da couve pode ser observado pela Tabela 8.

Confirmando os resultados obtidos com o β -caroteno sintético, o teor de β -caroteno da couve também não foi alterado por este procedimento. Em termos de luteína, houve perda de 32% devido parcialmente à dificuldade em transferir esse pigmento para o éter de petróleo. A perda de luteína, no entanto, não afetou o valor de vitamina A pois este pigmento não apresenta atividade vitamínica.

No caso da couve e de possivelmente outros vegetais folhosos, a determinação da composição de carotenóides e valor de vitamina A poderia ser realizada sem saponificação da amostra, pois a grande diferença de polaridade entre seus dois carotenóides

TABELA 8: Efeito da saponificação à frio (Procedimento I) na composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (UI/100g) de couve.

CAROTENÓIDE/ VALOR VITAMINA A	CONCENTRAÇÃO ¹	
	NÃO SAPONIFICADO	SAPONIFICADO
β -caroteno	28,35 $\pm$ 0,27 a	28,35 $\pm$ 0,54 a
luteína	46,05 $\pm$ 1,48 a	31,27 $\pm$ 1,22 b
valor de vitamina A	4.725 $\pm$ 46 a	4.726 $\pm$ 90 a

¹Média e desvio padrão de determinações em duplicata.

Valores da mesma linha com diferentes letras apresentam diferença significativa ao nível de 5%.

principais, β -caroteno e luteína, permite uma separação simples e fácil. Excluindo esta etapa que envolve tempo e cuidado não só na saponificação, mas também na lavagem para retirada do álcali, a análise poderia ser mais rápida e facilmente realizada, diminuindo ainda a possibilidade de perdas quantitativas de alguns carotenóides.

Para os carotenóides de mamão, no entanto, observou-se um comportamento diferente.

As composições de carotenóides de amostras de mamão determinadas sem e com saponificação por dois procedimentos (à quente e à temperatura ambiente) podem ser comparadas através da Tabela 9.

Neste caso, a saponificação mostrou ser indispensável para se obter uma boa separação. Nas amostras não saponificadas as frações dos carotenóides hidroxilados se apresentaram misturadas mesmo depois de recromatografadas, levando conseqüentemente a uma quantificação não confiável.

A saponificação à frio por uma noite (procedimento I) mostrou ser eficiente na hidrólise dos ésteres de carotenóides ao contrário das afirmações encontradas na literatura (Davies, 1976). Cabe ressaltar porém, que essas afirmações foram feitas baseadas no trabalho de Quackenbush (1973) que comparou saponificação à quente (56°C por 20 minutos) com um procedimento ao qual chamou de saponificação à frio por uma noite, mas que envolve na realidade, extração à frio por uma noite e saponificação por apenas uma hora.

TABELA 9: Efeito de dois procedimentos de saponificação na composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)¹ de mamão.

CAROTENÓIDE	NÃO SAPONIFICADO	SAPONIFICADO	SAPONIFICADO
		PROCEDIMENTO I	PROCEDIMENTO IV
β -caroteno	$1,71 \pm 0,03$ a	$1,70 \pm 0,08$ a	$1,54 \pm 0,13$ a
γ -caroteno	$1,65 \pm 0,15$ a	$1,62 \pm 0,01$ a	$1,40 \pm 0,39$ a
mutatocromo	ND	ND	$0,18 \pm 0,39$
éster 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	$0,97 \pm 0,00$	ND	ND
éster- β -criptoxantina	$9,11 \pm 0,44$ ²	ND	ND
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	ND	$2,21 \pm 0,42$ a	$1,10 \pm 0,30$ b
β -criptoxantina	$3,14 \pm 0,44$ ³	$10,32 \pm 0,07$ a	$9,64 \pm 0,30$ b
anteraxantina	$3,48 \pm 1,01$	$6,09 \pm 1,31$ a	$4,07 \pm 0,72$ b
cis-licopeno	ND	ND	$3,11$ ⁴
licopeno	$47,46 \pm 0,51$ a	$45,47 \pm 0,76$ a	$41,74 \pm 1,64$ b
total	$67,54 \pm 0,20$	$67,42 \pm 2,35$	$62,71 \pm 3,41$

¹Média e desvio padrão de determinações em duplicata.

²Contém também éster do 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina.

³Contém também éster da anteraxantina.

⁴Separado somente em uma amostra.

ND: Não detectado

Valores da mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5%.

Comparando o procedimento I, saponificação à frio, com o procedimento IV, saponificação à quente da amostra dissolvida em etanol, observou-se que o primeiro apresentou uma boa retenção dos carotenóides enquanto o segundo causou redução nos teores de todos carotenóides, além da formação de produtos de degradação.

Em termos de β -caroteno a diferença não foi significativa, embora as amostras submetidas ao procedimento IV tenham apresentado um conteúdo levemente menor (1,70 e 1,54 $\mu\text{g/g}$ para os procedimentos I e IV respectivamente) acompanhado da formação de mutacromos.

Já para os carotenóides hidroxilados 5,6-monoeпоxi- β -criptoxantina, β -criptoxantina e anteraxantina, a saponificação à quente causou perdas significativas.

O conteúdo de licopeno também sofreu redução significativa durante a saponificação pelo procedimento IV, com formação de cis-licopeno.

4.2. Determinação quantitativa de provitamina A de frutas e vegetais

4.2.1. Avaliação do método da AOAC

As avaliações do método da AOAC reportadas se limitaram

a comparar os valores de vitamina A e as justificativas para as discrepâncias foram apresentadas baseando-se em suposições (Gebhardt et al., 1977; Zakaria et al., 1979; Bushay e Wilson, 1982).

Para melhor avaliar a eficiência do método, além de comparar os valores de vitamina A, a fração considerada como carotenos foi investigada. A fração obtida pelo método da AOAC foi saponificada e recromatografada em coluna empacotada com MgO ativado: hiflosupercel (1:1) usando como eluente gradiente de acetona em éter de petróleo. As frações então separadas foram identificadas e quantificadas.

No caso do mamão, foi detectado na fração de "carotenos", além do β -caroteno, o γ -caroteno, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e uma grande parte do conteúdo total da β -criptoxantina (Tabela 10). Sobrepondo os espectros de absorção desses carotenóides, observou-se, como era esperado, que todos contribuem na absorbância a 436 nm (Figura 4). O cálculo dos carotenóides que não possuem (γ -caroteno) ou que apresentam apenas 50% da atividade vitamínica do β -caroteno (5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e β -criptoxantina) como sendo β -caroteno, acarretou aumento no valor de vitamina A de 874 para 2.022 UI/100g, uma superestimação de 131% (Tabela 11). No entanto, a presença do licopeno não foi detectada, demonstrando que este carotenóide não elui da coluna com 10% de acetona em hexana, contrariando as afirmações de Bushway e Wilson (1982) e Zakaria et al. (1979) de que o licopeno

TABELA 10: Composição de carotenóides da fração de "carotenos" de mamão obtida pelo método da AOAC.

CAROTENÓIDE	CONCENTRAÇÃO (ug/g) ¹
β -caroteno	1,17 $\pm$ 0,15
γ -caroteno	1,64 $\pm$ 0,04
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	3,00 $\pm$ 0,03
β -criptoxantina	2,24 $\pm$ 0,58

¹Média e desvio padrão de determinações em duplicata.

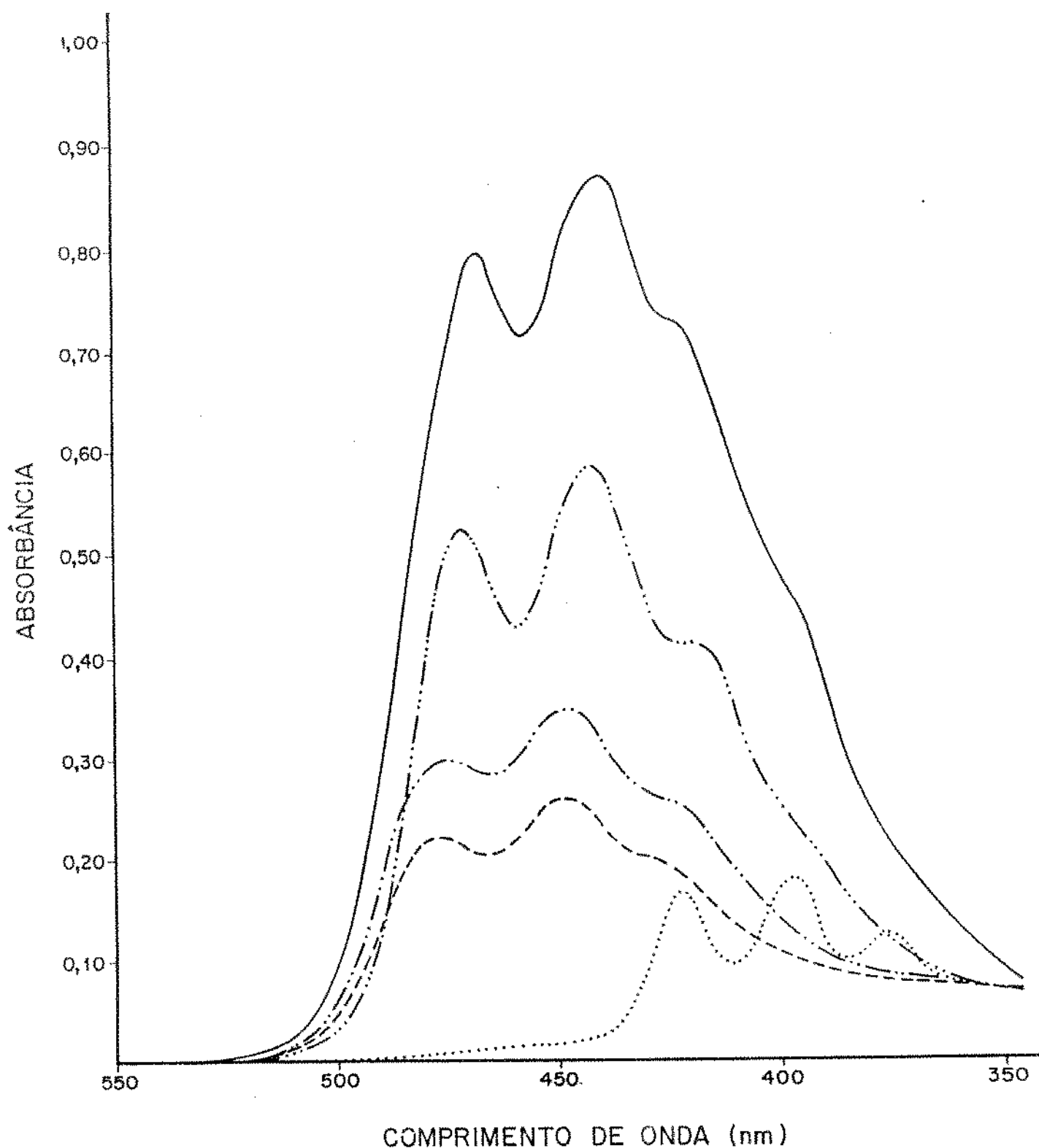


FIGURA 3: Espectros de absorção dos carotenóides constituintes da fração de carotenos obtida pelo método da AOAC: fração total(—); β -caroteno(---); γ -caroteno(.....); β -criptoxantina(-.-.-.); 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina(-.-.-.-.).

TABELA 11: Comparação do valor de vitamina A obtido pelo método da AOAC e pelo método de Rodriguez et al. simplificado.

AMOSTRA/MÉTODO	VALOR DE VITAMINA A (UI/100g) ¹
<u>Couve</u>	
AOAC	4.613 ± 391
Rodriguez et al. simplificado	4.726 ± 90
<u>Mamão</u>	
AOAC	2.022 ± 265
Rodriguez et al. simplificado	874 ± 65
¹ Média e desvio padrão de determinações em duplicata.	

também era quantificado no método da AOAC, levando inclusive os últimos autores a relatarem um valor de vitamina A em tomate cerca de quinze vezes maior que o obtido por CLAE.

Já para a couve, o valor de vitamina A obtido pelo método da AOAC foi menor (4.613 vs 4.726 UI/100g) (Tabela 11), obviamente decorrente do uso de quantidade fixa de solvente na extração (175 ml), neste caso insuficiente, deixando resíduos ainda coloridos. Foram necessários 400 ml de acetona para a extração completa dos pigmentos. O problema da superestimação do valor de vitamina A não ocorreu desde que nas amostras analisadas, apenas o β -caroteno foi eluído em concentração quantificável, pois o carotenóide monohidroxilado estava presente apenas em traços.

4.2.2. Avaliação do método de Rodriguez et al. (1976a) simplificado para determinação de provitamina A

Os métodos envolvendo colunas abertas tem sido considerados, sem nenhuma avaliação, demorados e poucos precisos por proponentes da CLAE (Stewart, 1977b; Zakaria et al., 1979; Simpson e Chichester, 1981; Bushway, 1985 e Chandler e Schwartz, 1987). O método de Rodriguez et al. (1976a) foi citado por Bushway e Wilson (1982) como tedioso e muito demorado, não considerando que o método determina a composição completa de carotenóides e pode

ser simplificado para a determinação de provitamina A.

A repetibilidade da versão simplificada do método de Rodriguez et al. (item 3.3.2.), baseada em cinco determinações realizadas para couve e mamão, pode ser avaliada através da Tabela 12. Em termos de β -caroteno, os coeficientes de variação de 1,2 e 6,7% para couve e mamão respectivamente, são comparáveis aos reportados por Bushway e Wilson (1982) utilizando CLAE (1,3 a 8,6%). Dados para o 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina e β -criptoxantina não foram encontrados na literatura.

Quanto ao tempo de análise observou-se que as críticas não se justificam, visto que se apenas a determinação do valor de vitamina A é desejada, a análise pode ser concluída em um dia para amostras que não necessitam de saponificação e em dois dias para amostras que requerem a etapa de saponificação, além do método descrito por Rodriguez et al. simplificado permitir a análise de várias amostras simultaneamente.

Considerando os resultados dos itens 4.1.1., 4.1.2. e 4.2. pode se concluir que o método de Rodriguez et al. simplificado ainda é a melhor opção para se determinar o valor de vitamina A de frutas e vegetais no Brasil, país onde o acesso ao CLAE, solventes de alta pureza e manutenção do equipamento ainda representa um grande problema.

Embora o método COST (Brubacker et al., 1985) não tenha sido avaliado neste trabalho, é evidente que este método acarretaria uma subestimação do valor de vitamina A em amostras como o

TABELA 12: Repetibilidade do método de Rodriguez et al. simplificado.

CAROTENÓIDES com ATIVIDADE VITAMÍNICA A						
AMOSTRA	β -CAROTENO		5,6-MONDEPOXI- β -CRIPTOXANTINA		β -CRIPTOXANTINA	
	$\mu\text{g/g}^1$	C.V.(%)	$\mu\text{g/g}^1$	C.V.(%)	$\mu\text{g/g}^1$	C.V.(%)
Couve	42,64 $\pm$ 0,50	1,2	-----	-----	-----	-----
Mamão	0,75 $\pm$ 0,05	6,7	2,86 $\pm$ 0,37	13,0	4,09 $\pm$ 0,34	8,3

¹Média de 5 determinações.

mamão que contem β -criptoxantina, um carotenóide com contribuição apreciável e variável, dependendo da cultivar, no valor de vitamina A.

4.3. Composição de carotenóides do mamão

4.3.1. Caracterização dos carotenóides encontrados no mamão

Nove carotenóides foram identificados no mamão, cujas características encontram-se resumidas na Tabela 13 e as estruturas apresentadas na Figura 4.

Os carotenóides β -caroteno, γ -caroteno, β -zeacaroteno, γ -caroteno e licopeno foram identificados baseando-se principalmente na ordem de eluição na coluna (Figuras 5, 6 e 7) e nos espectros de absorção característico (Figuras 8, 9 e 10). A ausência de grupos substituintes nos cinco carotenóides foi confirmada por cromatografia em camada delgada de sílica gel desenvolvida com 3% de metanol em benzeno, na qual eluíram com a frente do solvente. A configuração trans dos pigmentos foi confirmada por reação de fotoisomerização catalizada por iodo, que resultou num deslocamento hipsocrômico de 4 nm.

O 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina foi identificado inicialmente através de seu espectro de absorção (Figura 8) e comportamento na camada delgada. O valor de R_f de 0,42 indicou a

TABELA 13: Caracterização dos carotenóides encontrados em mamão.

CAROTENÓIDE	NOME SEMISISTEMÁTICO	MÁXIMOS DE ABSORÇÃO EM ÉTER DE PETRÓLEO ¹	R _f ²	REAÇÕES QUÍMICAS
β -caroteno	β,β -caroteno	476 448 (424)	0,98	trans +
γ -caroteno	7,8,7,8-tetrahidro- γ,γ -caroteno	423 399 377	0,99	trans +
β -zeacaroteno	7,8-dihidro- β,γ - caroteno	452 425 405	0,98	trans +
γ -caroteno	β,γ -caroteno	488 459 434	0,98	trans +
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	5,6-epoxi-5,6-diidro β,β -caroten-3-ol	470 442 418	0,42	trans +,acet. +, met. -,epox.5,6 +
β -criptoxantina	β,β -caroten-3-ol	476 448 (424)	0,47	trans +,acet. +, met. -
antheraxantina	5,6-epoxi-5,6-didei- dro- β,β -caroteno- 3,3-diol	470 442 418	0,10	trans +,acet. +, met. -,epox.5,6 +
licopeno	γ,γ -caroteno	499 469 442	0,98	trans +
criptoflavina	5,8-epoxi-5,8-diidro β,β -caroten-3-ol	451 426 (403)	0,34	trans +,acet. +, met. -

¹O parentesis indica ombro no lugar do pico.²Valores obtidos em placas de sílica gel ativada por 2 horas a 110°C e desenvolvida com 3% de metanol em benzeno.

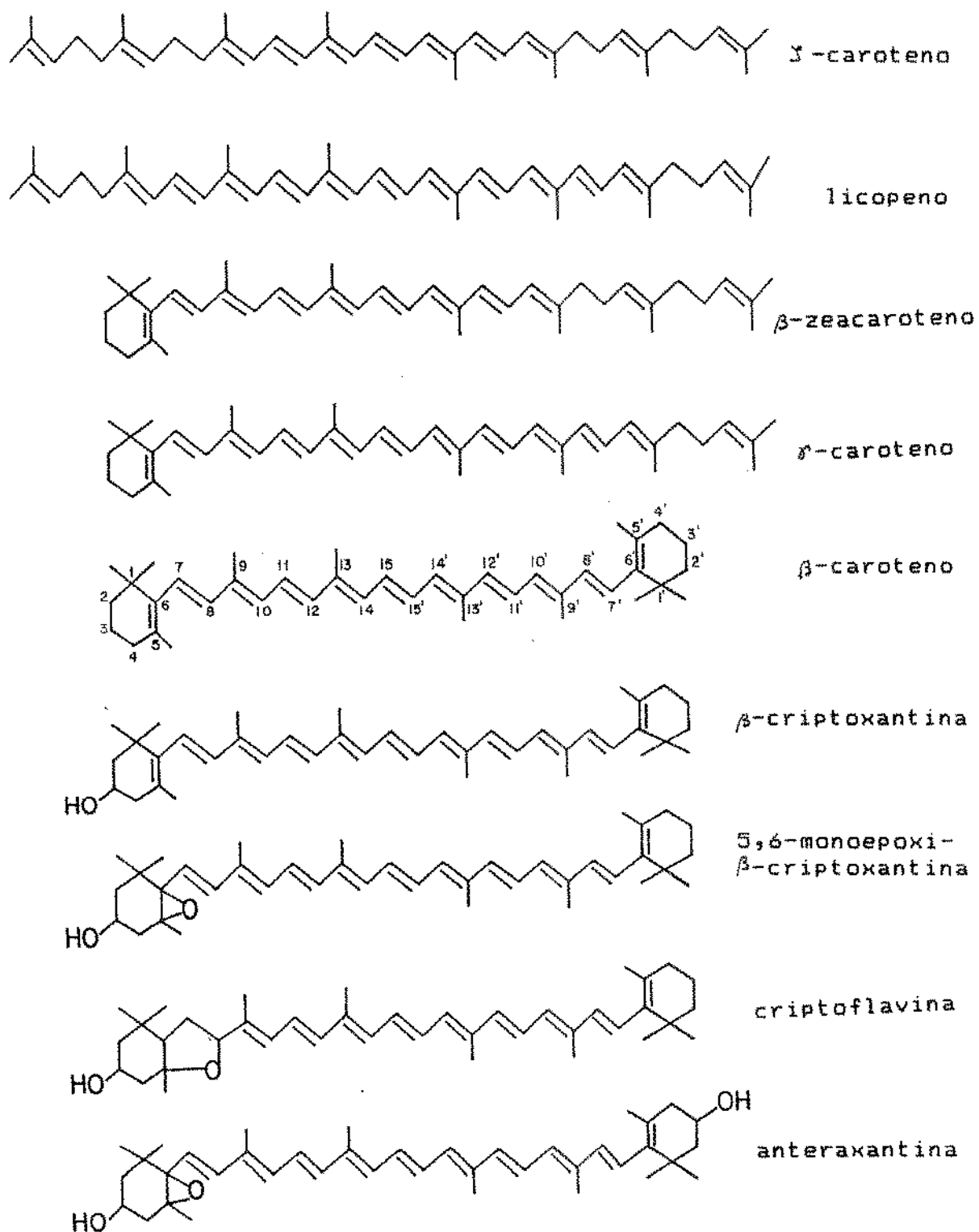


FIGURA 4: Estruturas dos carotenóides encontrados em mamão.

FASE ESTACIONARIA: Hiflosupercel:MgO (2:1)

FASE MOVEL: gradiente de éter etílico ou acetona em éter de petróleo

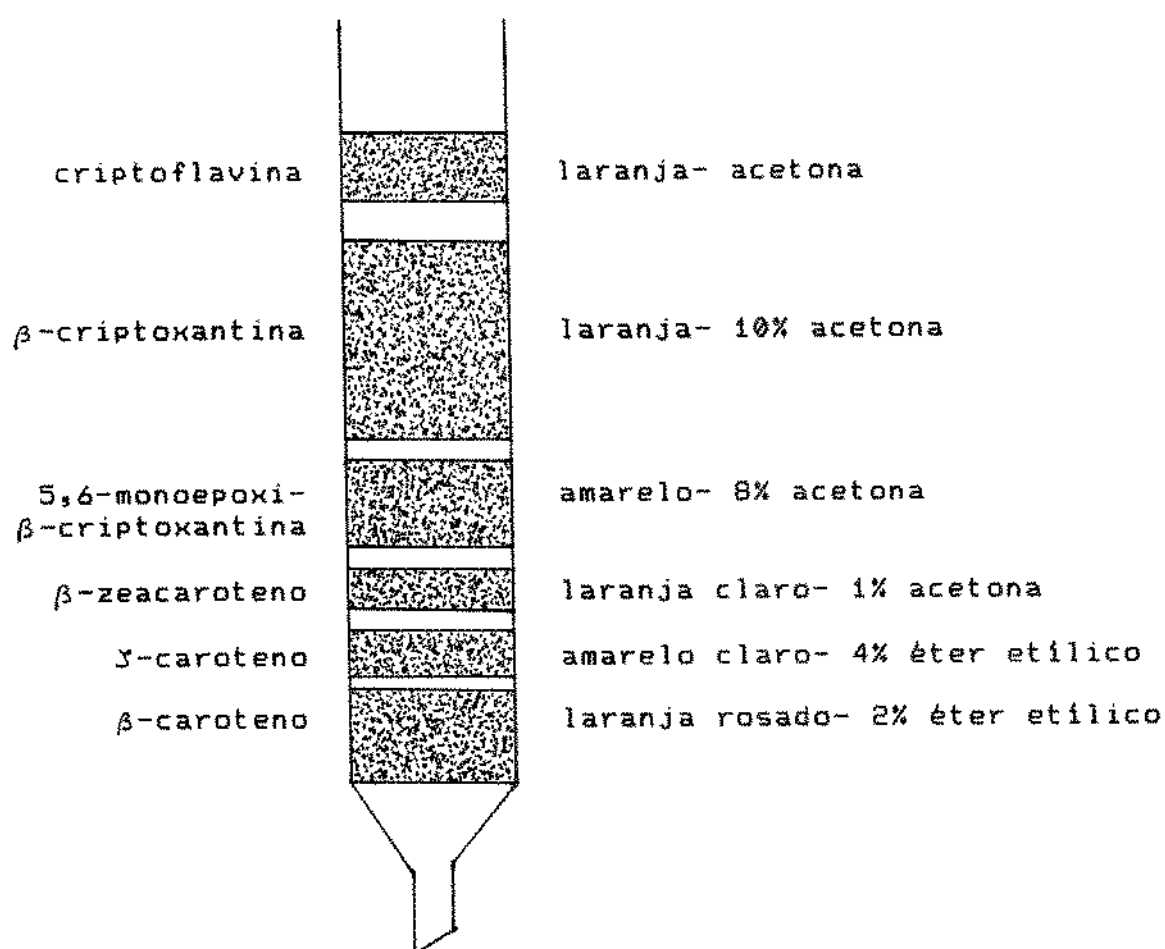


FIGURA 3. Separação dos carotenóides de mamão cultivar Comum

FASE ESTACIONÁRIA: (A) Hiflosupercel:MgO (2:1)
(B) óxido de alumínio

FASE MÓVEL: gradiente de éter etílico ou acetona em éter de petróleo

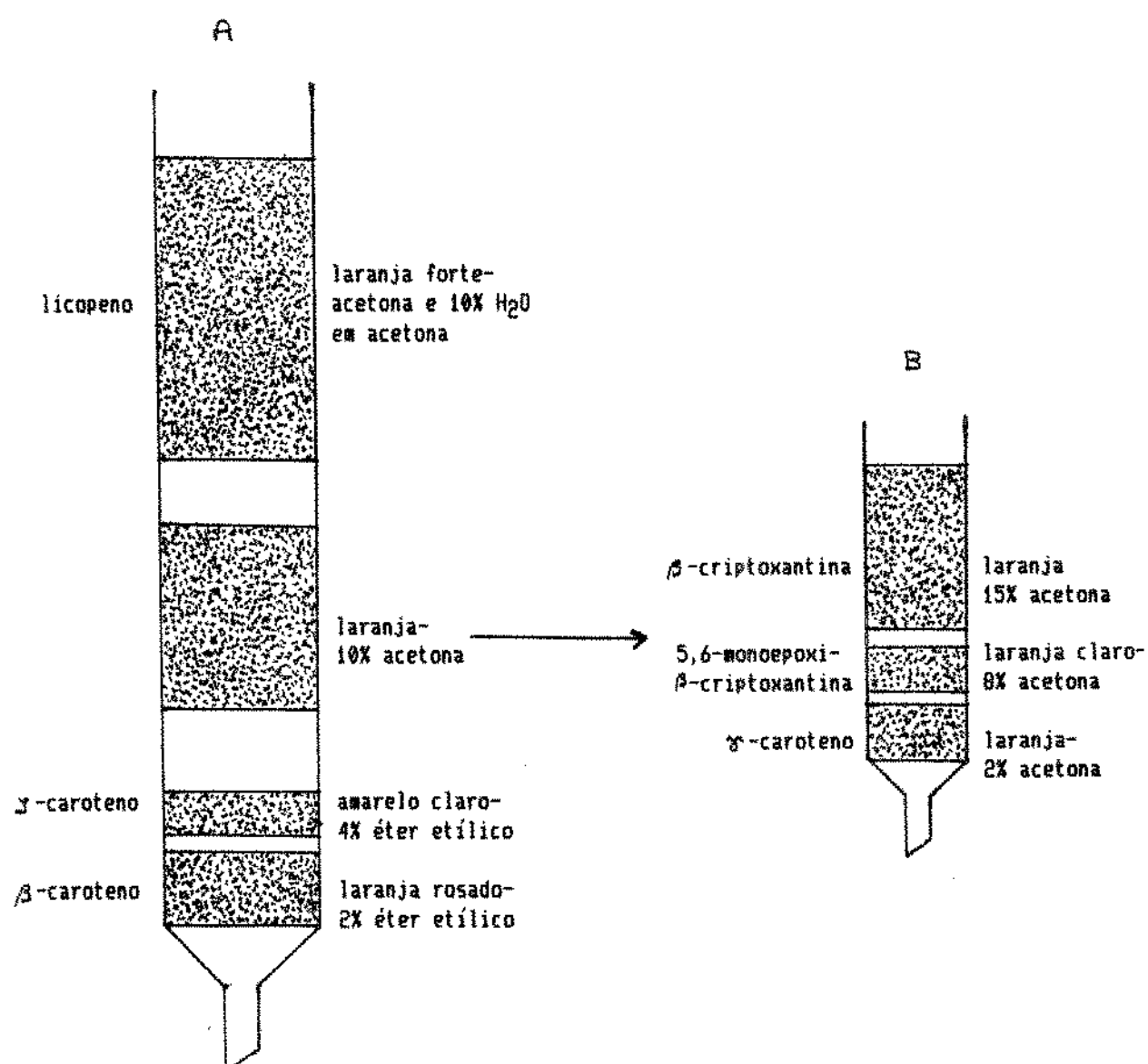


FIGURA 6: Separação dos carotenóides de mamão cultivar Solo

FASE ESTACIONARIA: Hiflosupercel:MgO ativado (1:1)

FASE MÓVEL: gradiente de acetona em éter de petróleo

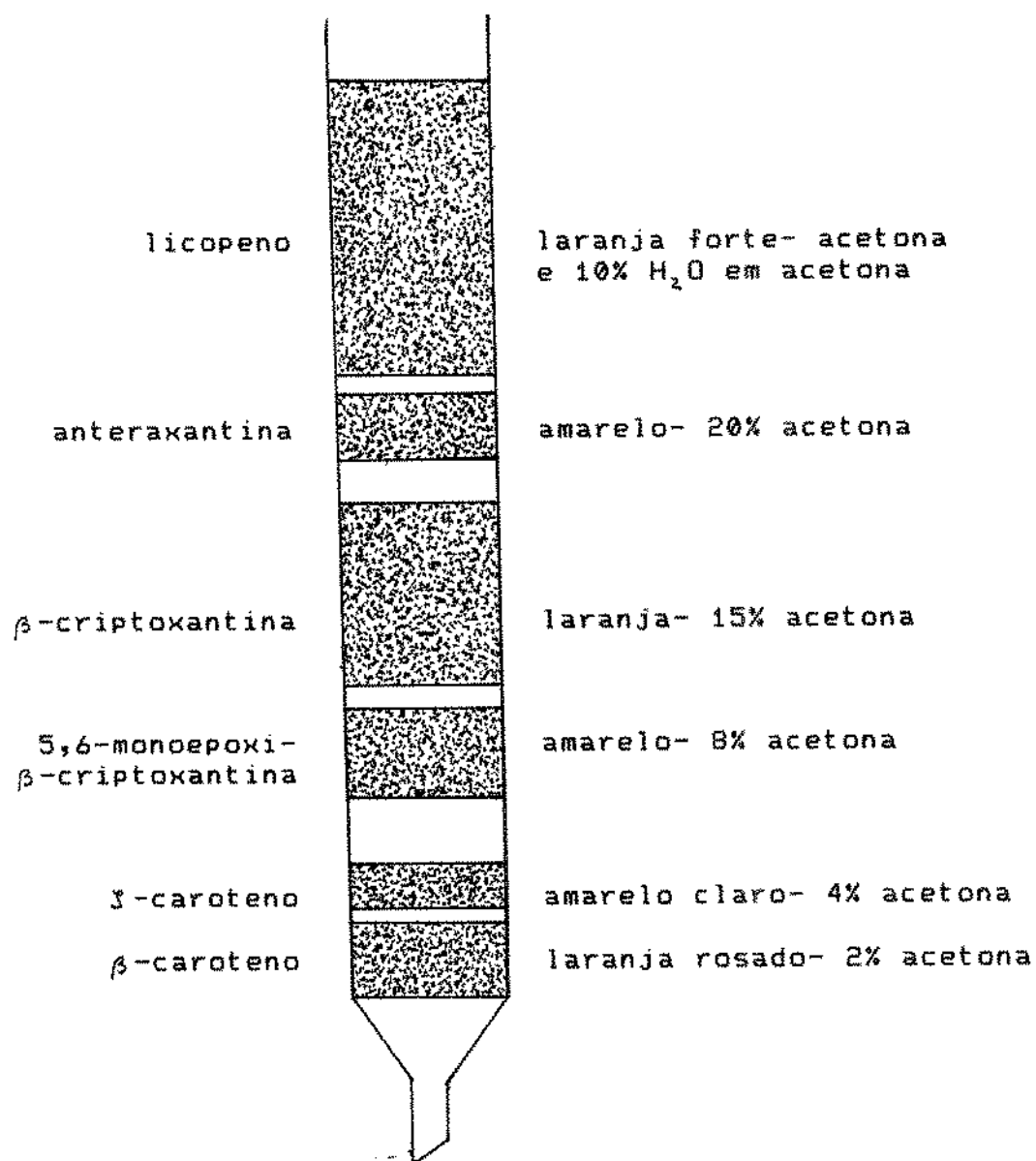


FIGURA 7. Separação dos carotenóides de mamão cultivares Formosa e Tailândia

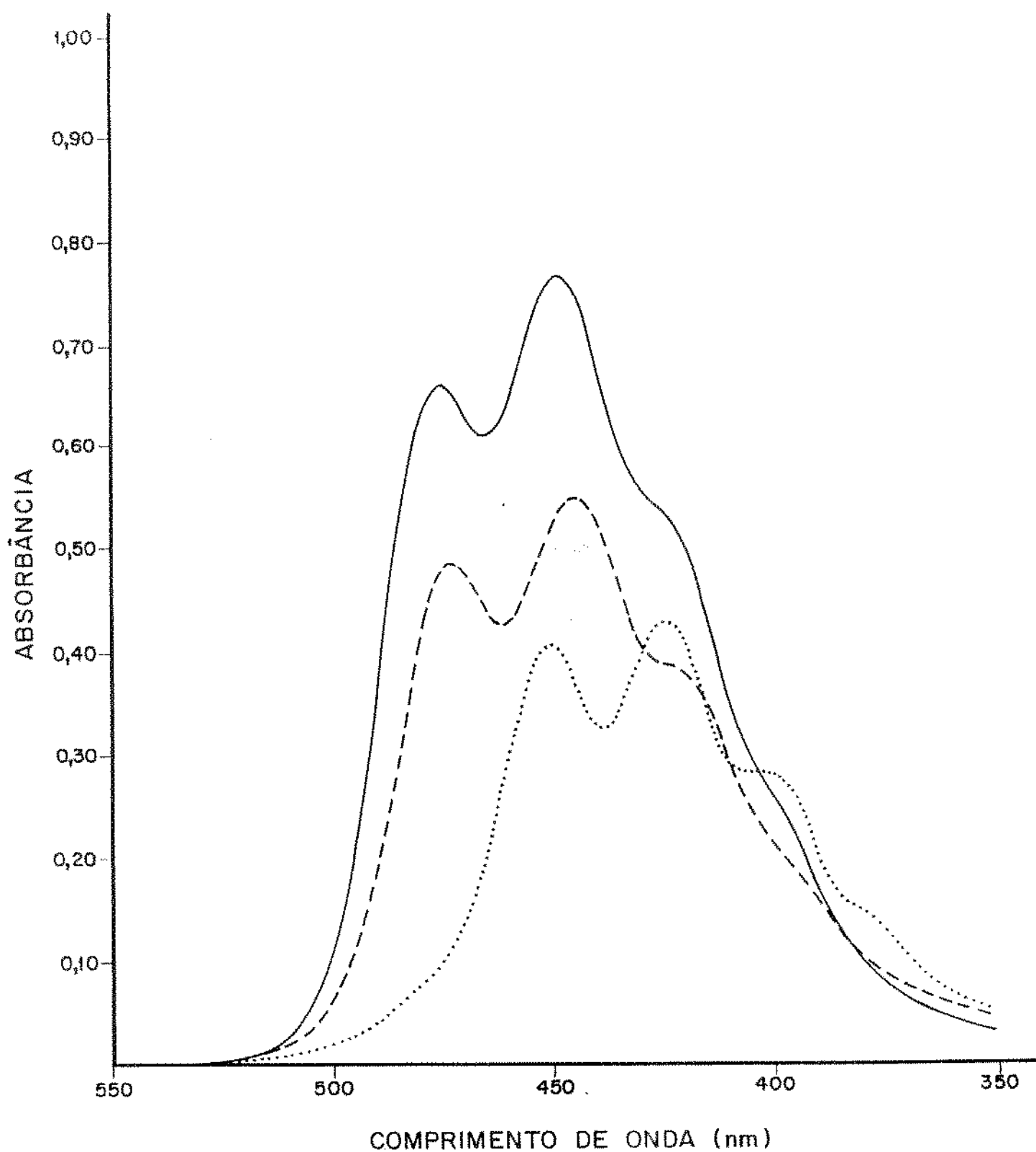


FIGURA 8: Espectros de absorção em éter de petróleo do β -caroteno e β -criptoxantina(—); 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (---); criptoflavina(.....).

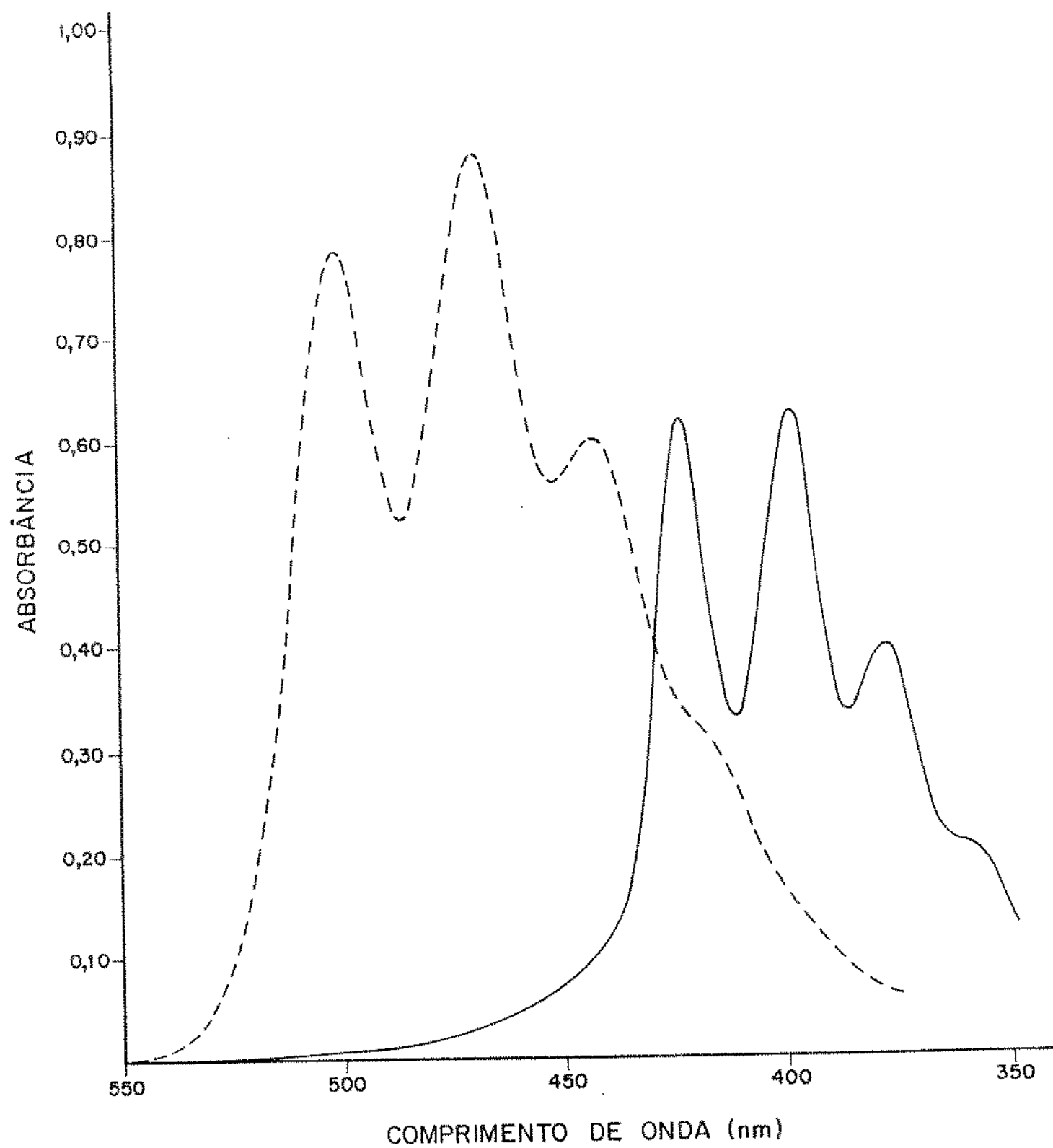


FIGURA 9: Espectros de absorção em éter de petróleo do β -caroteno (—); licopeno(-----).

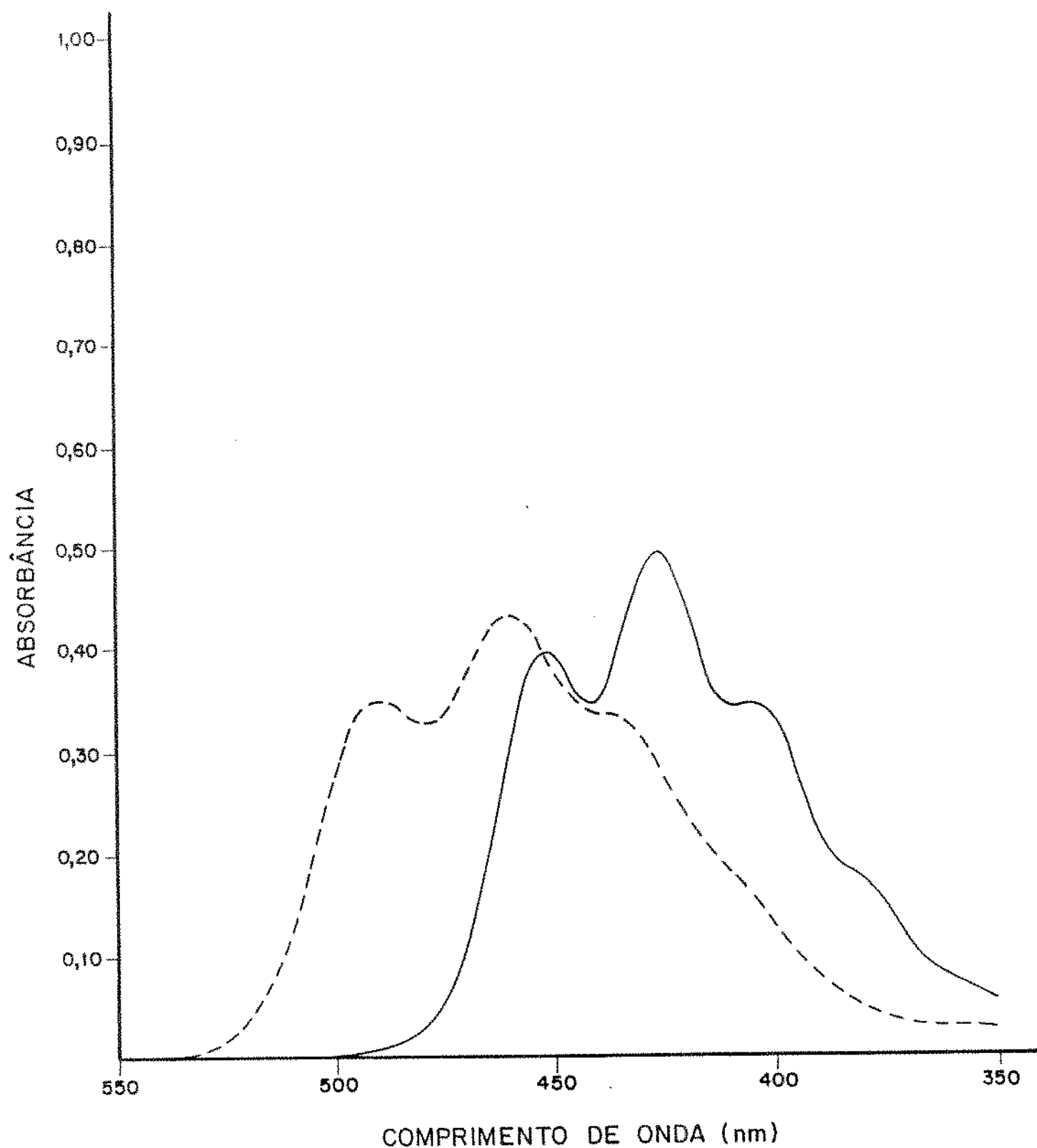


FIGURA 10: Espectros de absorção em éter de petróleo do β -zeacaroteno(—); α -caroteno(-----).

presença de um grupo hidroxila confirmada pela reação positiva à acetilação. A presença do grupo epóxido na posição 5,6 foi indicada pela mudança da coloração amarela para azul, após exposição da placa à vapores de HCL e pelo máximo de absorção 5 nm mais baixo que o da β -criptoxantina. Com adição de HCL 0,1 N ao pigmento dissolvido em etanol, observou-se um deslocamento hipsocrômico de 20 nm, refletindo a transformação do 5,6 epóxido a 5,8 epóxido.

A identificação da β -criptoxantina foi conseguida através dos seguintes parâmetros: espectro característico do β -caroteno (Figura 8), presença de uma hidroxila em posição não alílica, indicada pelo valor de Rf igual a 0,47 e confirmada pelas respostas positiva à acetilação e negativa à metilação.

A anteraxantina foi identificada seguindo o mesmo raciocínio utilizado na identificação do 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina. Neste caso, o baixo valor de Rf (0,10) e saída da coluna com solventes mais polares, indicaram a presença de dois grupos hidroxilas, confirmada pela reação positiva à acetilação.

A presença de um grupo hidroxila na fração identificada como criptoflavina foi indicada pelo valor de Rf igual à 0,34 e foi confirmada pela resposta positiva à acetilação. A sua posição não alílica foi demonstrada pela resposta negativa à metilação. A presença do grupo epóxido foi detectada pela mudança da coloração amarela da mancha para azul após exposição da placa à vapores de HCL. Os máximos de absorção de 22 nm mais baixos que os da β -criptoxantina confirmaram a localização na posição 5,8.

Fazendo um estudo sobre carotenóides de mamão de polpa amarela, Subbarayan e Cama (1964) detectaram esses mesmos carotenóides com exceção do β -zeacaroteno e 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, além de um grande número de derivados epóxidos do β -caroteno e β -criptoxantina e isômeros cis do β -caroteno em quantidades entre 0,02 a 0,5 $\mu\text{g/g}$. Observando que no referido trabalho as amostras foram dissolvidas em etanol e saponificadas à 60°C por 30 minutos seguida de permanência durante 1 noite à temperatura ambiente e considerando os resultados encontrados no item 4.1.2. do presente estudo (efeito da etapa de saponificação), a presença dos carotenóides epoxidados e cis citada pelos autores torna-se discutível.

4.3.2. Diferenças entre cultivares

A comparação da composição de carotenóides das quatro cultivares de mamão mais comercializadas no estado de São Paulo pode ser feita através da Tabela 14.

Os resultados mostram claramente a existência de diferenças quali e quantitativa entre as cultivares. O β -zeacaroteno e criptoflavina foram detectados apenas na cultivar Comum, enquanto o γ -caroteno esteve presente somente nos mamões cultivar Solo. Como era esperado, foi verificada no mamão de polpa amarela (Comum) a ausência total do licopeno, que nos mamões de polpa

TABELA 14: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) de mamões das cultivares Comum, Solo, Formosa e Tailândia.

CAROTENÓIDE	COMUM		SOLO		FORMOSA		TAILÂNDIA	
	INTERVALO	$M \pm DP^1$	INTERVALO	$M \pm DP^1$	INTERVALO	$M \pm DP^1$	INTERVALO	$M \pm DP^1$
β -caroteno	0,6-2,9	$1,2 \pm 0,9$	0,9-3,6	$2,5 \pm 1,0$	0,7-8,1	$3,7 \pm 2,7$	1,7-3,1	$2,3 \pm 0,7$
γ -caroteno	0,3-1,7	$0,8 \pm 0,5$	0,3-2,5	$1,4 \pm 0,8$	1,1-2,7	$1,6 \pm 0,5$	1,6-2,6	$2,0 \pm 0,4$
β -zeacaroteno	ND -0,2	$0,1 \pm 0,0$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
δ -caroteno	ND	ND	0,2-0,3	$0,2 \pm 0,0$	ND	ND	ND	ND
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	1,0-3,6	$2,0 \pm 1,1$	TR.	TR.	0,7-5,8	$2,8 \pm 1,4$	1,8-2,7	$2,1 \pm 0,3$
β -criptoxantina	5,0-9,9	$8,1 \pm 1,7$	6,7-12,4	$9,1 \pm 2,4$	4,0-11,7	$7,0 \pm 2,4$	7,8-12,6	$9,7 \pm 1,8$
antheraxantina	ND	ND	TR.	TR.	1,6-3,6	$2,6 \pm 0,8$	ND -6,3	$4,0 \pm 2,9$
licopeno	ND	ND	16,7-31,0	$21,0 \pm 5,8$	14,6-29,6	$22,8 \pm 5,1$	32,1-47,3	$40,0 \pm 6,3$
criptoflavina	0,4-1,1	$0,8 \pm 0,3$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TOTAL	8,6-18,7	$13,0 \pm 3,8$	27,9-44,4	$34,2 \pm 6,6$	27,8-56,2	$40,4 \pm 9,4$	51,6-67,4	$60,3 \pm 5,8$

¹Média e desvio padrão de 5 amostras de cada cultivar. Cada amostra foi obtida pela homogeneização de 3 ou 5 frutos.

TR.:traços

ND:não detectado

vermelha (Solo, Formosa e Tailândia) foi o carotenóide principal, representando respectivamente 61, 56 e 66% do total. Nos mamões cultivar Comum, houve predominância da β -criptoxantina, constituindo 62% do total de carotenóides. Também a anteraxantina foi encontrada somente nos mamões das cultivares de polpa vermelha.

Em termos quantitativos, a maior diferença observada foi o alto conteúdo de licopeno apresentado pela cultivar Tailândia. Esta diferença justifica a sua coloração vermelha mais intensa, razão pela qual é a cultivar preferida pelos consumidores.

Embora uma comparação direta com o trabalho de Philip e Chen (1988) não possa ser feita, pois a cultivar não foi especificada, chama atenção o elevado conteúdo de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina reportado pelos autores. Não se pode deixar de observar também que no referido trabalho, as concentrações foram calculadas em termos de β -caroteno considerando o valor de absortividade da β -criptoxantina igual ao do β -caroteno.

4.3.3. Efeito geográfico

Na tentativa de se encontrar uma explicação para as variações encontradas entre amostras da mesma cultivar, a influência da região de cultivo na composição de carotenóides de mamão cultivar Formosa foi investigada.

A Tabela 15 apresenta as composições de carotenóides dos

TABELA 13: Efeito geográfico na composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) de mamão cultivar Formosa.

CAROTENÓIDE	SÃO PAULO		BAHIA	
	INTERVALO	MÉDIA $\pm$ DP ¹	INTERVALO	MÉDIA $\pm$ DP ¹
β -caroteno	0,7- 2,0	1,4 $\pm$ 0,5	4,1- 8,1	6,1 $\pm$ 1,4
γ -caroteno	1,1- 2,7	1,7 $\pm$ 0,6	1,1- 1,8	1,5 $\pm$ 0,3
5,6-monoepoxi- β -criptoxantina	2,6- 5,8	3,8 $\pm$ 1,3	0,7- 2,8	1,8 $\pm$ 0,8
β -criptoxantina	4,0- 6,9	5,3 $\pm$ 1,1	6,2-11,7	8,6 $\pm$ 2,2
anteraxantina	1,6- 1,9	1,8 $\pm$ 0,1	2,5- 3,6	3,3 $\pm$ 0,4
licopeno	14,6-23,9	19,1 $\pm$ 4,1	22,3-29,6	26,5 $\pm$ 2,6
TOTAL	27,8-37,8	33,0 $\pm$ 4,4	38,2-56,2	47,8 $\pm$ 6,6

¹Média e desvio padrão de 5 amostras para cada região de cultivo. Cada amostra foi obtida pela homogeneização de 3 frutos.

mamões cultivados no estado de São Paulo e no estado da Bahia.

Qualitativamente, nenhuma diferença foi encontrada, mas em termos quantitativos, observou-se nos mamões cultivados na Bahia conteúdos maiores de todos carotenóides com exceção do 5,6-monoeoxi- β -criptoxantina. As principais diferenças foram nos teores de β -caroteno (6,1 vs 1,4 $\mu\text{g/g}$), de β -criptoxantina (8,6 vs 5,3 $\mu\text{g/g}$) e de licopeno (26,5 vs 19,1 $\mu\text{g/g}$), sugerindo que a temperatura favorece a síntese desses carotenóides.

Resultados semelhantes foram encontrados por Padula e Rodriguez-Amaya (1986) que observaram que goiabas da região quente do nordeste brasileiro eram mais ricas em β -caroteno que as goiabas cultivadas em São Paulo.

4.3.4. Comparação do valor de vitamina A .

Os valores de vitamina A das quatro cultivares de mamão, bem como a porcentagem de contribuição de cada provitamina estão apresentadas na Tabela 16.

Os principais carotenóides precursores de vitamina A do mamão são o β -caroteno (100% de atividade) e a β -criptoxantina (50% de atividade). Nos mamões cultivares Comum, Solo, Formosa (São Paulo) e Tailândia, a β -criptoxantina foi o principal contribuinte, representando respectivamente 60,6; 63,7; 44,5 e 58,7% do total do valor de vitamina A, enquanto na cultivar Formosa

TABELA 16: Comparação do valor de vitamina A de quatro cultivares de mamão.

CULTIVAR	PROVITAMINA A (% CONTRIBUIÇÃO)	VALOR VITAMINA A ¹ UI/100g
Comum	β -caroteno (18,2%), β -zeacaroteno (0,5%), 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (14,8%), β -criptoxantina (60,6%), criptoflavina (5,9%)	1.118 $\pm$ 344
Solo	β -caroteno (34,9%), γ -caroteno (1,4%), 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (tr.), β -criptoxantina (63,7%)	1.199 $\pm$ 311
Formosa-São Paulo	β -caroteno (23,7%), 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (31,8%), β -criptoxantina (44,5%)	988 $\pm$ 229
Formosa-Bahia	β -caroteno (52,4%), 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (10,3%), β -criptoxantina (37,2%)	1.934 $\pm$ 471
Tailândia	β -caroteno (28,4%), 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina (12,9%), β -criptoxantina (58,7%)	1.377 $\pm$ 225

¹Média e desvio padrão de 5 amostras. Cada amostra foi obtida pela homogeneização de 3 ou 5 frutos.

tr.: traços

(Bahia), o principal contribuinte foi o β -caroteno (52,4% do total). O β -caroteno também contribuiu de forma significativa nos mamões cultivares Comum, Solo, Formosa (São Paulo) e Tailândia (18,2; 34,9; 23,7 e 28,4% do total, respectivamente), enquanto a contribuição do 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina foi apreciável nos mamões cultivar Formosa de São Paulo (31,8% do total).

A localização do grupo epóxido na posição 5,6 e não na 5',6' foi confirmada por Godoy et al. (1989) através de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear, demonstrando que o composto possui atividade vitamínica A de aproximadamente 50%, pois o epóxido se encontra no anel com hidroxila na posição 3, deixando livre um anel β -ionona.

Uma vez que o menor e o maior valor de vitamina A foram dados pelos mamões cultivar Formosa de São Paulo e Bahia, respectivamente, observou-se que a influência da região de cultivo foi maior que a causada pela diferença de cultivares.

As grandes diferenças entre cultivares não se refletiram no valor de vitamina A porque a maior variação entre cultivares foi no conteúdo de licopeno, um carotenóide que não apresenta atividade vitamínica. Maiores diferenças de valor de vitamina A entre cultivares foram verificadas em manga por Godoy e Rodriguez-Amaya (1988) e em abóboras e morangas por Arima e Rodriguez-Amaya (1988 a,b).

Recentemente, Speek et al. (1988) determinaram por CLAE, a concentração de β -caroteno de vegetais e frutas da Tailândia,

dentre eles mamões maduros (cultivares e número de amostras analisadas não especificadas). Um conteúdo de β -caroteno de $0,38 \mu\text{g/g}$ e valor de vitamina A de 57 RE/100g foram reportados. O teor de β -caroteno assim como o valor de vitamina A são muito menores que as concentrações e valores encontrados neste trabalho ($0,6$ a $8,1 \mu\text{g/g}$ e 98,8 a 193,4 RE/100g respectivamente).

4.4. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de cajá

No cajá foram identificados sete carotenóides, cujas características estão resumidas na Tabela 17 e as estruturas apresentadas na Figura 11.

A primeira fração foi identificada como α -caroteno através da ordem de eluição na coluna (Figura 12) e do espectro de absorção característico (Figura 13). A ausência de grupos substituintes foi confirmada por cromatografia em camada delgada de sílica gel desenvolvida com 3% de metanol em benzeno, na qual eluiu com a frente do solvente. A configuração *trans* do pigmento foi confirmada após reação de fotoisomerização catalizada por iodo, que resultou num efeito hipsocrômico de 4 nm. Esta confirmação afastou a possibilidade da primeira fração ser isômero *cis* do β -caroteno.

A segunda e terceira fração foram identificada como β -caroteno e γ -caroteno, respectivamente, seguindo os mesmos cri-

TABELA 17: Caracterização dos carotenóides encontrados em cajá.

CAROTENÓIDE	NOME SEMISISTEMÁTICO	MÁXIMOS DE ABSORÇÃO			R _F ²	REAÇÕES QUÍMICAS
		EM ÉTER DE PETRÓLEO ¹				
α-caroteno	β-,ε-caroteno	470	441	419	0,98	trans +
β-caroteno	β-,β-caroteno	476	448	(424)	0,99	trans +
γ-caroteno	7,8,7,8- tetraidro- ψ-,ψ-caroteno	423	499	377	0,99	trans +
zeinoxantina	β-ε-caroten-3-ol	471	443	420	0,47	trans +, acet. +, met. -
β-criptoxantina	β,β-caroten-3-ol	476	448	(424)	0,49	trans +,acet. +, met. -
criptoflavina	5,8-epoxi-5,8-diidro -β,β-caroten-3-ol	451	426	(403)	0,34	trans +,acet. +, met. -
luteína	β,ε-caroten-3,3-diol	469	442	422	0,11	trans +,acet. +, met. +

¹O parentesis indica ombro no lugar do pico.

²Valores obtidos em placas de sílica gel ativada por 2 horas a 110°C e desenvolvida com 3X de metanol em benzeno.

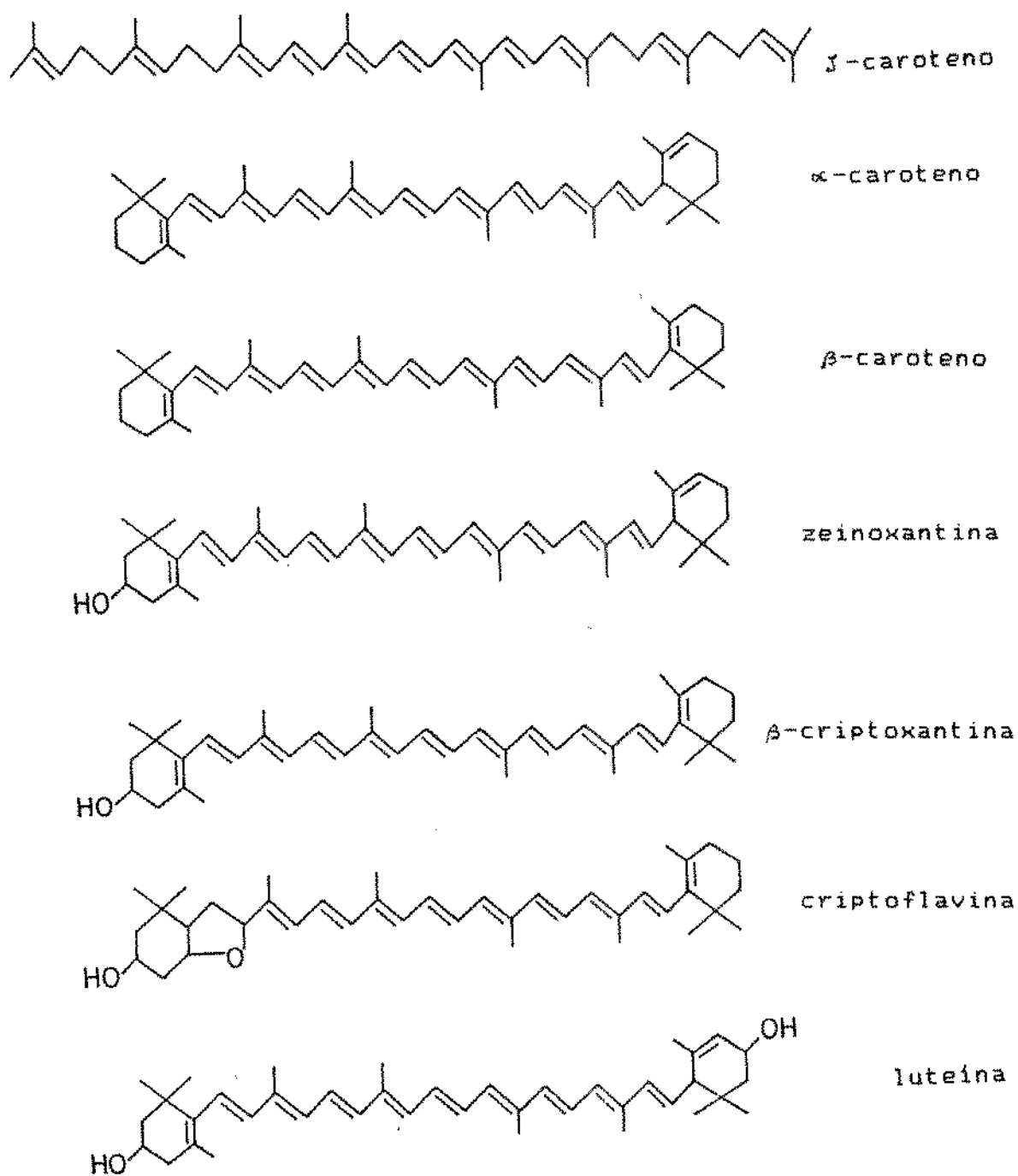


FIGURA 11: Estruturas dos carotenóides encontrados em cajá.

FASE ESTACIONARIA: Hiflosupercel:MgO (2:1)

FASE MOVEL: gradiente de éter etílico ou acetona em éter petróleo

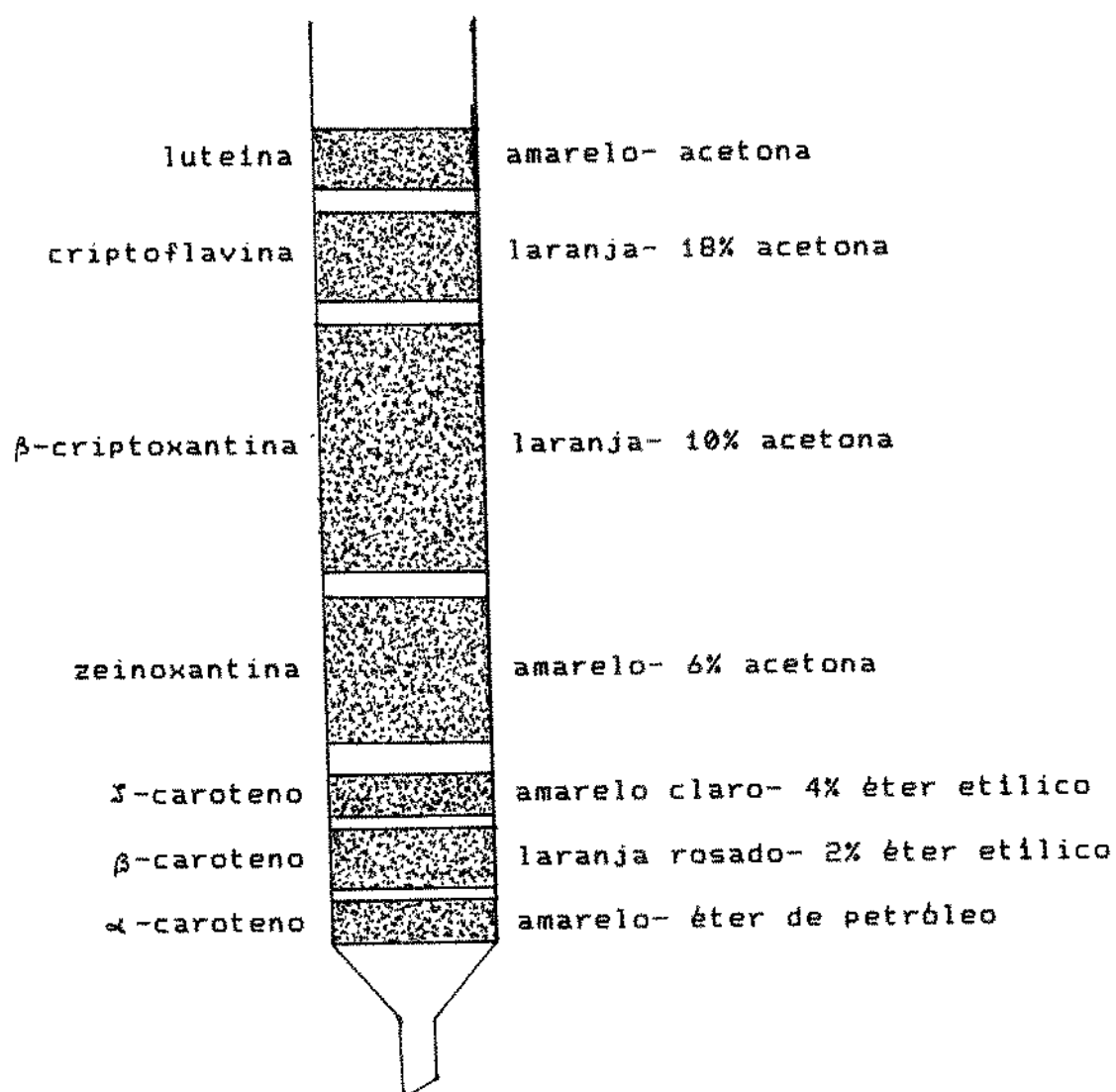


FIGURA 12. Separação dos carotenóides de cajá.

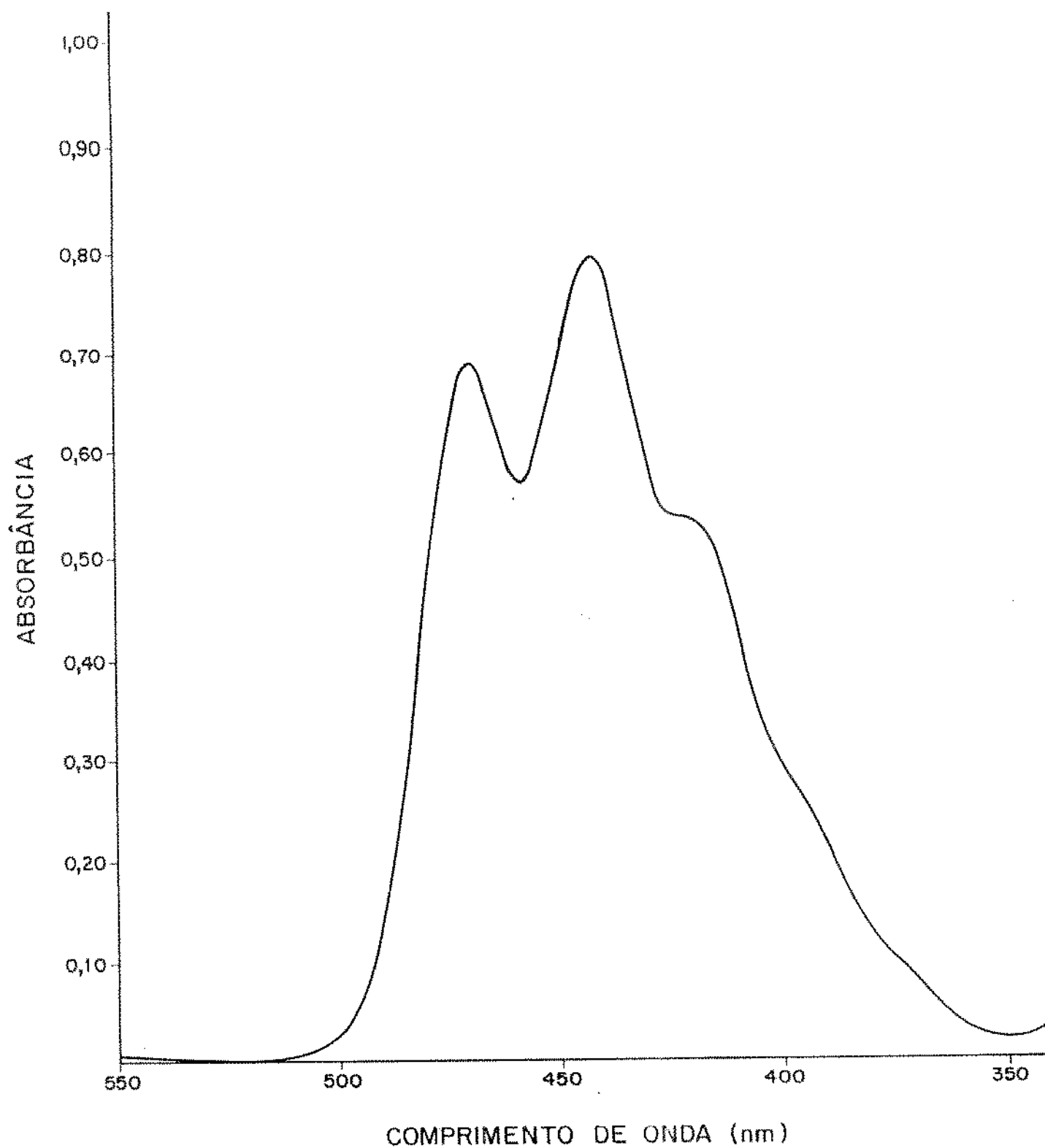


FIGURA 13: Espectros de absorção em éter de petróleo do α -caroteno; zeinoxantina e luteína.

térios utilizados na identificação destes pigmentos no mamão.

A quarta fração apresentou o espectro característico de um carotenóide com estrutura básica do α -caroteno (Figura 13). O R_f de 0,47 na camada delgada indicou a presença de uma hidroxila, que foi confirmada pela reação positiva à acetilação. Pela localização desse grupo no anel β -ionona, demonstrada pela resposta negativa à metilação com metanol acidificado, o pigmento foi identificado como zeinoxantina.

A quinta e sexta fração foram identificadas como β -criptoxantina e criptoflavina, respectivamente, seguindo os mesmo raciocínio utilizado na identificação destes carotenóides no mamão.

A última fração foi identificada como luteína através do espectro de absorção característico (Figura 13), ordem de saída na coluna e comportamento cromatográfico em camada delgada. A presença de dois grupos hidroxila, indicada pelo valor de R_f igual a 0,11, foi confirmada pela resposta positiva à acetilação. A posição alílica de uma das hidroxilas foi confirmada pela resposta positiva à metilação, resultando em um composto com características de um carotenóide monohidroxilado.

Em termos quantitativos, o cajá apresentou um conteúdo total de carotenóides de 25,8 $\mu\text{g/g}$, sendo o pigmento mais abundante a β -criptoxantina, constituindo 64% do total.

Além da β -criptoxantina que mais contribuiu no valor de vitamina A, equivalente a 74% do total, foram identificados três outros carotenóides com atividade vitamínica: α -caroteno, β -ca-

roteno e criptoflavina.

Considerando que o cajá também é consumido sem casca, foi realizada uma determinação para avaliar o efeito da remoção da casca no conteúdo de carotenóides e valor de vitamina A.

Em termos qualitativo esta operação não causou nenhuma alteração, no entanto reduziu a concentração total de carotenóides de 25,8 para 17,3 µg/g (Tabela 18). Individualmente, observou-se um aumento moderado nos teores de α -caroteno, β -caroteno e luteína e uma grande redução, aproximadamente 50%, de β -criptoxantina. Isto nos leva a supor que no cajá, o α -caroteno, β -caroteno e luteína estão mais concentrados na polpa, enquanto a β -criptoxantina está mais concentrada na casca.

Em termos de valor vitamínico, a remoção da casca causou um decréscimo de 1.867 para 1.350 UI/100g, sugerindo que em termos nutricionais é melhor se consumir o cajá com a casca, além de proporcionar melhor rendimento (8g/fruto vs 2g/fruto).

Em termos analíticos, a análise do cajá demonstrou a eficiência e precisão da coluna empacotada com MgO:hiflosupercel na proporção de 1:2 na separação dos carotenóides. A separação de carotenóides com polaridade semelhantes como α -caroteno e β -caroteno e zeinoxantina e β -criptoxantina pode ser obtida sem recromatografia. A separação precisa destes carotenóides é importante para o cálculo exato do valor de vitamina A, visto que o α -caroteno apresenta apenas 50% da atividade do β -caroteno e a zeinoxantina é inativa.

TABELA 18: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (UI/100g) de cajá.

CAROTENOIDE/ VALOR VITAMINA A	POLPA COM CASCA		POLPA SEM CASCA ²
	INTERVALO	MÉDIA $\pm$ DP ¹	
α -caroteno	0,4- 1,3	0,9 $\pm$ 0,4	2,1
β -caroteno	1,5- 1,9	1,6 $\pm$ 0,2	2,6
γ -caroteno	0,1- 0,4	0,3 $\pm$ 0,1	ND
zeinoxantina	3,7- 5,0	4,3 $\pm$ 0,6	1,7
β -criptoxantina	13,6-19,2	16,5 $\pm$ 2,3	8,3
criptoflavina	0,9- 2,5	1,8 $\pm$ 0,7	0,6
luteína	0,2- 0,7	0,4 $\pm$ 0,3	2,0
TOTAL	21,7-28,0	25,9 $\pm$ 3,0	17,3
VALOR VITAMINA A	1575-1992	1867 $\pm$ 199	1350

¹Média e desvio padrão de 4 amostras. Cada amostra foi obtida pela homogeneização de 5 a 7 frutos.

²Determinação de 1 amostra obtida pela homogeneização da polpa de 20 frutos

ND: não detectado

A identificação da zeinoxantina exige um maior cuidado para não ser confundida com a β -criptoxantina que é um carotenóide ativo. De acordo com Rodriguez-Amaya (1989), a confusão em relação a estes dois carotenóides monohidroxilados é grande, tanto que muitas vezes até seus nomes aparecem trocados na literatura. No caso do cajá, se a zeinoxantina fosse erroneamente identificada como β -criptoxantina haveria uma superestimação do valor de vitamina A de 19 e 11% para polpa com casca e polpa sem casca, respectivamente.

5. CONCLUSOES

1. A acetona é o solvente de extração mais eficiente. A adição de agentes antioxidantes e neutralizantes na etapa de extração é desnecessária quando as amostras são analisadas logo após a sua desintegração.
2. O procedimento de saponificação realizado com solução metanólica de KOH 10%, por uma noite e à temperatura ambiente hidrolisou eficientemente os ésteres de carotenóis e apresentou melhor retenção dos carotenóides.
3. Os procedimentos de saponificação à quente causaram perdas de carotenóides e provocaram a formação de derivados cis e epoxidados.
4. A etapa de saponificação é desnecessária para determinação da composição de carotenóides e valor de vitamina A por cromatografia emcoluna aberta de amostras como a couve, mas indispensável para amostras como o mamão.
5. O método da AOAC é inadequado para determinação do valor do valor de vitamina A porque o volume do solvente de extração é fixo, os carotenóides menos ativo ou inativos são igualmente

quantificados como β -caroteno e os carotenóides ativos podem ser desconsiderados.

6. O método descrito por Rodriguez et al. (1976a) simplificado para determinação do valor de vitamina A mostrou ser o mais apropriado e versátil porque o volume de solvente de extração é ajustado ao tipo de amostra, permite a separação de todas provitaminas, considera apenas os carotenóides ativos e suas respectivas atividades e apresenta boa repetibilidade.
7. NO mamão foram identificados nove carotenóides: β -caroteno, γ -caroteno, β -zeacaroteno, δ -caroteno, 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, β -criptoxantina, anteraxantina, criptoflavina e licopeno. O valor de vitamina A variou de 988 a 1.934 UI/100g, sendo os principais precursores, o β -caroteno e a β -criptoxantina.
8. As composições quali e quantitativa de carotenóides de mamão variam de acordo com a cultivar. O β -zeacaroteno e criptoflavina apareceram apenas na cultivar Comum e o δ -caroteno só na cultivar Solo. O licopeno e anteraxantina foram encontrados somente nos mamões de polpa vermelha (Solo, Formosa e Tailândia). O pigmento principal da cultivar Comum (polpa amarela) foi a β -criptoxantina, enquanto nas cultivares Solo, Formosa e Tailândia (polpa vermelha) foi o licopeno.

9. A região de cultivo também influencia no conteúdo de carotenóides. Mamões "Formosa" cultivados na Bahia apresentaram teores maiores de carotenóides, especialmente de β -caroteno, que acarretou um valor de vitamina A marcadamente superior que dos produzidos em São Paulo.

10. No cajá foram identificados sete carotenóides: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, zeinoxantina, β -criptoxantina, criptoflavina e luteína. A β -criptoxantina foi o pigmento principal e o que mais contribuiu no valor de vitamina A (1867 UI/100g). A remoção da casca causou uma redução de 28% no valor de vitamina A.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALMEIDA, L.B. e PENTEADO, M.V.C. (1987a). Carotenóides e valor de vitamina A da mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) consumida em São Paulo. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S.Paulo* 23:52.
- ALMEIDA, L.B. e PENTEADO, M.V.C. (1987b). Carotenóides com atividade pró-vitáminica A de cenouras (*Daucus carota* L.) comercializadas em São Paulo, Brasil. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S.Paulo* 23:133.
- AOAC (1984). *Official Methods of Analysis*, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, p.834, Arlington, VA.
- ARIMA, H.K. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1988a). Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. *J. Micronutr. Anal.* 4:177.
- ARIMA, H.K. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1988b). Carotenoid composition and vitamin A value of squash and a pumpkin from northeastern Brazil. *Arch. Latinoamer. Nutr.* (no prelo).
- BARANYAI, M., MATUS, Z. e SZABOLCS, J. (1982). Determination, by HPLC, of carotenoids in paprika products. *Acta Alimentaria*, 11:309.

BENDICK,A. (1989a). Carotenoids and the imune response. J. Nutr. 119:112.

BENDICK,A. (1989b). Symposium conclusions: biological action of carotenoids. J. Nutr. 119:135.

BRUBACKER,G., MULLER-MULOT,W. e SOUTHGATE,D.A.T. (1985). Carotene in foodstuffs. In **Methods for Determination of Vitamins in Foods**, p.33-50. Elsevier Applied Science Publishers, London.

BUREAU,J.L. e 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. e WILSON,A.M. (1982). Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. Can. Inst. Food Sci. J. 15:165.

CECCHI,H.M. e RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. (1981a). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. J. Food Sci. 46:147.

- CECCHI, H.M. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1981b). Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. *Ciência e Cultura* 33:72.
- CHANDLER, L.A. e SCHWARTZ, S.J. (1987). HPLC Separation of *cis-trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 52:669.
- COLDITZ, G.A., BRANCH, L.G., LIPNICK, R.J., WILLET, W.C., ROSNER, B., POSNER, B.M. e HENNEKENS, C.H. (1985). Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:32.
- CURL, A.L. (1960). The carotenoids of Japanese persimmons. *J. Food Sci.* 25:670.
- CURL, A.L. (1962). Reticulataxanthin and tangeraxanthin, two carbonyl carotenoids from tangerine peel. *J. Food Sci.* 27:537.
- DAVIES, B.H. (1976). Carotenoids. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed. (Ed.) T.W. Goodwin, p.38-165. Academic Press, London .
- EDWARDS, C.G. e LEE, C.Y. (1986). Measurement of provitamin A carotenoids in fresh and canned carrots e green peas. *J. Food Sci.* 51:534.

- GEBHARDT,S.E., ELKINS,E.R. e HUMPHREY,J. (1977). Comparison of two methods for determining the vitamin A value of Clingstone peaches. *J. Agric. Food Chem.* 25:629.
- GODOY,H.T. e RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. (1987). Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. *Int. Food Sci. Technol.* 22:451.
- GODOY,H.T. e RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. (1988). Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. *Lebensm. Wiss. Technol.*(no prelo)
- GODOY,H.T., RODRIGUEZ-AMAYA,D.B., BRITTON,G. e CONNOR,A.E. (1989). Confirmation of the structure of papaya β -cryptoxanthin mono-epoxide. *Food Chem.* (no prelo).
- GROSS,J., GABAI,M. e LIFSHITZ,A. (1971). Carotenoids in juice of Shamouti orange. *J. Food Sci.* 36:466.
- GROSS,J., GABAI,M. e LIFSHITZ,A. (1972). The carotenoids of the avocado pear, *Persea americana*, Nabal variety. *J. Food Sci.* 37:589.
- GROSS,J., GABAI,M. e LIFSHITZ,A. (1973). Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. *Phytochemistry* 12:2259.

- KHACHIK,F., BEECHER,G.R. e WHITAKER,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.
- KRINSKY,N.I. (1989). Carotenoids and cancer in animal models. *J. Nutr.* 119:1233.
- LIAAEN-JENSEN,S. (1971). Isolation, reactions. Em *Carotenoids*, (Ed.) O. Isler,p.61-188. Berklauser Verlag, Basel.
- MATHEWS-ROTH,M.M. (1985). Carotenoids and cancer prevention experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.*, 57:717.
- MERCADANTE,A.Z. e RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. (1988). Composição de carotenóides e valor de vitamina A em hortaliças folhosas nativas brasileiras. Trabalho apresentado no IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Belo Horizonte, MG.
- MOSZIK,G., BATA,M., JAVOR,T., MORON,F., SZABOLCS,J. e TOTH,G. (1983). Cytoprotective effect of vitamin A and carotenoids on the injury of the gastric mucosa caused by 0,6 M hydrochloric acid. *Taplakozastud Helyzetle Feladatia Magyarorszagon.* 8:781.

NAS-NRC (1980). **Recommended Dietary Allowances**, 9th. ed., p.55-71.

National Academy of Sciences, Washington,D.C.

NOGA,G. e LENZ,F. (1983). Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Chromatographia 17:139.

ONG,D.E. e CHYTIL,F. (1989). Vitamin A and cancer. In **Vitamins and Hormones**, vol.40. (Ed.) G. D. Aurbach, p.105. Academic Press, New York.

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

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

PHILIP,T. e CHEN,T. (1988). Quantitative analysis of major carotenoid fatty acid esters in fruit by liquid chromatography: persimmon and papaya. **J. Food Sci.** 53:1720.

QUACKENBUSH,F.W. (1973). Use of heat to saponify xantophyll esters and speed analysis for carotenoids in feed materials: Collaborative study. **J. Assoc. Off. Chem.** 56:748.

- QUACKENBUSH, F.W. e MILLER, S.L. (1972). Composition and analysis of the carotenoids in Marigold petals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 55:617.
- QUACKENBUSH, F.W. e SMALLIDGE, R.L. (1986). Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantitation of provitamins A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69:767.
- RAHMAN, F.M.M. e BUCKLE, K.A. (1980). Pigment changes in capsicum cultivars during maturation and ripening. *J. Food Technol.* 15:241.
- RAMOS, D.M.R. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1987). Determination of the vitamin A value of common Brazilian leaf vegetables. *J. Micronutr. Anal.* 3:147.
- REEDER, S.K. e PARK, G.L. (1975). A specific method for the determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58:595.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1985). Os carotenóides como precursores de vitamina A. *Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.* 19:227.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1989). Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J. Micronut. Anal.* 5:191.

- RODRIGUEZ-AMAYA,D.B., BOBBIO,P.A. e BOBBIO,F.O. (1983). Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit *Cyphomanda betacea*. *Food Chem.* 12:61.
- RODRIGUEZ-AMAYA,D.B., RAYMUNDO,L.C., LEE,T.C., SIMPSON,K.L. e CHICHESTER,C.O. (1976a). Carotenoid pigments changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* 40:615.
- RODRIGUEZ-AMAYA,D.B., TANAKA,Y., KATAYAMA,T., SIMPSON,K.L., LEE,T.C. e CHICHESTER,C.O. (1976b). Hydroxylation of β -carotene on Micro-Cel C. *J. Agric. Food Chem.* 24:819.
- ROUCHOUD,J., MOONS,C. e MEYER,J.A. (1984). Effects of pesticide treatments on the carotenoid pigments of lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 32:1241.
- SCHWARTZ,S.J. e PATRONI-KILLAM,M. (1985). Detection of cis-trans carotene isomers by two-dimensional thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33:1160.
- SIMPSON,K.L. e CHICHESTER,C.O. (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 1:351.
- SIMPSON,K.L. e TSOU,S.C.S. (1986). Vitamin A and provitamin composition of foods. In *Vitamin A Deficiency and its Control*, (Ed.) J.C. Bauerfeind, p.461-478. Academic Press, New York.

- SPEEK,A.J., SPEEK-SAICHUA,S. e SCHREURS,W.H.P. (1988). Total carotenoid and β -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chem.* 27:245.
- SPEEK,A.J., TEMALILWA,C.R. e SCHRIJVER,J. (1986). Determination of β -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem.* 19:65.
- STEWART,I. (1977a). High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60:132.
- STEWART,I. (1977b). Provitamin A and carotenoid content of citrus orange. *J. Agric. Food Chem.* 25:1132.
- STEWART,I. e WHEATON,T.A. (1973). Conversion of β -citraurin to reticulataxanthin and β -apo-8¹-carotenal to citranaxanthin during the isolation of carotenoids from citrus. *Phytochem.* 12:2947.
- SUBBARAYAN,C. e CAMA,H.R. (1964). Carotenoids in *Carica papaya* (Papaya fruit). *Indian J. of Chem.* 2:451.

SIMPSON,K.L., TSOU,S.C.S. e CHICHESTER,C.O. (1985). Carotenes. In **Methods of Vitamin Assay** 4th. ed., (Ed.) J. Augustin, B.P. Klein, D.Becker e P.B.Venugopal, p.185-220. John Wiley & Sons, New York.

TAVARES,C.A. e RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. (1988). Determinação de provitaminas A e carotenóides em alimentos "in natura" e processados. Trabalho apresentado no IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte, MG.

TAYLOR,R.F. (1983). Chromatography of carotenoids and retinoids. **Adv. Chromatogr.** 22:157.

YAMAMOTO,H.Y. (1964). Comparison of the carotenoids in yellow- and red- fleshed *Carica papaya*. **Nature** 7:1049.

ZAKARIA,M., SIMPSON,K.L., BROWN,P.R. e KRSTULOVIC,A. (1979). Use of reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. **J. Chromatogr.** 176:109.

ZIEGLER,R.G. (1989). A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. **J. Nutr.** 119:116.