

7
QUANTIFICAÇÃO DE PROVITAMINAS A E
CAROTENÓIDES MAJORITARIOS EM FRUTOS E HORTALIÇAS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

03/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

QUANTIFICAÇÃO DE PROVITAMINAS A E
CAROTENÓIDES MAJORITARIOS EM FRUTOS E HORTALIÇAS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

VIKTOR CHRISTIAN WILBERG

ORIENTADORA:

PROFA. DRA. DÉLIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE

Parecer

ALIMENTOS

*Este exemplar corresponde a redação final
da Tese defendida por Viktor Christian
Wilberg e aprovada pela Comissão Julga-
dora em 05.02.92.*

Délia B. R.

BANCA EXAMINADORA

Delia R. Amaya

Prof. Dra. Délia Rodrigues Amaya
(Orientadora)

Suplente

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(membro)

Heloisa M. Cecchi

Prof. Dra. Heloisa Máscia Cecchi
(membro)

Suplente

Prof. Dra. Marielene de Vuono C. Penteado
(membro)

Eidionar Angelucci

Prof. Dr. Eidionar Angelucci
(membro)

Francisco Maugeri Filho

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(membro)

Adilma Regina Pippa Scamparini

Prof. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
(membro)

Campinas, 05 de fevereiro de 1992.

Ao meu irmão Julius Arnold,
pela amizade e confiança
demonstradas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Delia B. Rodriguez - Amaya pelo apoio e orientação que permitiram a conclusão deste trabalho.

Aos professores da FEA/UNICAMP, funcionários, colegas de turma e amigos pelo incentivo.

À Adriana, Dr. Antonio Gomes, Claudio, Luiz Carlos, Marcelo Chaves, pelo valioso apoio técnico. Ao Marcelo Ramos e Timótheo pelo não menos valioso apoio administrativo.

À ABIA pela doação das cópias e das capas.

INDICE

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 - Carotenóides de Urucum	5
2.2 - Carotenóides de Hortaliças Folhosas	8
2.3 - Carotenóides de Frutas	11
2.3.1 - Goiaba	13
2.3.2 - Manga	14
2.3.3 - Tomate	16
2.3.4 - Mamão	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 - Amostragem e Preparo da Amostra	22
3.2 - Análise da Matéria-prima	24
3.3 - Determinação de Carotenóides	25
3.3.1 - Etapas pré-cromatográficas: extração de carotenóides	25
3.3.1.1 - Cuidados preliminares	25
3.3.1.2 - Extração de frutas	26
3.3.1.3 - Ação de diferentes solven- tes na extração	29
3.3.1.4 - Extração de produtos pro- cessados de frutas	30

3.3.1.5 - Extração de hortaliças fo- lhosas	32
3.3.1.6 - Extração de sementes de urucum	35
3.3.2 - Preparo de padrões	35
3.3.2.1 - Beta-caroteno	36
3.3.2.2 - Alfa-caroteno	37
3.3.2.3 - Luteína	37
3.3.2.4 - Licopeno	38
3.3.2.5 - Beta-criptoxantina	38
3.3.2.6 - Bixina	39
3.3.3 - Quantificação por CLAE	39
3.3.3.1 - Urucum	41
3.3.3.2 - Hortaliças e frutas	42
3.3.4 - Quantificação de bixina por espec- trofotometria	44
3.4 - Avaliação da Precisão e da Exatidão	44
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 - Composição da Matéria-prima	47
4.2 - Padronização do Método	53
4.2.1 - Pureza dos padrões	53
4.2.2 - Curvas padrão	63
4.2.3 - Avaliação dos solventes na extração dos carotenóides de frutas	70

4.2.4 - Estabelecimento das condições cromatográficas	70
4.3 - Teores de Bixina - Norbixina em Sementes de Urucum	78
4.4 - Teores de Provitamina A e Carotenóide Principal de Hortaliças Folhosas	83
4.5 - Teores de Provitamina A e Carotenóide Principal de Frutos e Produtos Processados	93
4.5.1 - Goiaba	93
4.5.2 - Manga	97
4.5.3 - Tomate	100
4.5.4 - Mamão	105
5 - CONCLUSÕES	111
6 - RECOMENDAÇÃO	112
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8 - APÊNDICE	123

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Distribuição dos carotenóides em grupos representativos de frutos.	12
Tabela 2 - Pigmentos de tomate em diferentes graus de amadurecimento.	19
Tabela 3 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de goiaba.	48
Tabela 4 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de manga.	49
Tabela 5 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de tomate.	50
Tabela 6 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de mamão	51
Tabela 7 - Teores de umidade das amostras de sementes de urucum e de hortaliças folhosas.	52
Tabela 8 - Padrões qualitativos para CLAE.	54
Tabela 9 - Extração dos carotenóides de goiaba com diferentes solventes.	71
Tabela 10 - Extração dos carotenóides de mamão com diferentes solventes.	72
Tabela 11 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba: fase estacionária C18	73
Tabela 12 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba: fase estacionária SILICA-GEL	74

Tabela 13 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba: fase estacionária AMINA	75
Tabela 14 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba: fase estacionária: CIANO	76
Tabela 15 - Teores de carotenóides totais em sementes de urucum: métodos espectrofotométricos.	79
Tabela 16 - Teores de bixina - norbixina em sementes de urucum: métodos CLAE.	82
Tabela 17 - Teores de beta - caroteno em hortaliças folhosas (sem saponificação).	86
Tabela 18 - Teores de alfa - caroteno em hortaliças folhosas (sem saponificação).	87
Tabela 19 - Teores de luteína em hortaliças folhosas (sem saponificação)	88
Tabela 20 - Teores de beta - caroteno em hortaliças folhosas (com saponificação).	89
Tabela 21 - Teores de alfa - caroteno em hortaliças folhosas (com saponificação).	90
Tabela 22 - Teores de luteína em hortaliças folhosas (com saponificação).	91
Tabela 23 - Teores de beta - caroteno em amostras de goiaba (e em produtos processados).	95
Tabela 24 - Teores de licopeno em amostras de goiaba (e em produtos processados).	96
Tabela 25 - Teores de beta - caroteno em amostras de manga (e em produtos processados).	98

Tabela 26 - Teores de beta - caroteno em amostras de tomate (e em produtos processados).	101
Tabela 27 - Teores de licopeno em amostras de tomate (e em produtos processados).	102
Tabela 28 - Teores de beta - caroteno em amostras de mamão (e em produtos processados).	106
Tabela 29 - Teores de beta - criptoxantina em amostras de mamão (e em produtos processados).	107
Tabela 30 - Teores de licopeno em amostras de mamão (e em produtos processados).	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Representação esquemática da extração de frutas.	29
Figura 2 - Representação esquemática da extração de frutas para ensaio de solventes.	31
Figura 3 - Representação esquemática da extração de produtos processados de frutas.	33
Figura 4 - Representação esquemática da extração de hortaliças folhudas.	34
Figura 5 - Espectro de absorção e cromatograma de alfa - caroteno.	55
Figura 6 - Espectro de absorção e cromatograma de beta - caroteno.	56
Figura 7 - Espectro de absorção e cromatograma de licopeno.	57
Figura 8 - Espectro de absorção e cromatograma de luteína.	58
Figura 9 - Espectro de absorção e cromatograma de beta-criptoxantina.	59
Figura 10 - Espectro de absorção e cromatograma de bixina.	60
Figura 11 - Espectro de absorção e cromatograma de nor-bixina.	61
Figura 12 - Espectro de absorção e cromatograma de F 1 (urucum).	62
Figura 13 - Curva padrão de beta - caroteno.	64
Figura 14 - Curva padrão de alfa - caroteno.	65

Figura 15 - Curva padrão de luteína.	66
Figura 16 - Curva padrão de licopeno.	67
Figura 17 - Curva padrão de beta - criptoxantina.	68
Figura 18 - Curva padrão de bixina.	69
Figura 19 - Cromatograma típico de extrato de urucum.	81
Figura 20 - Cromatograma típico de extrato de caruru, com saponificação.	84
Figura 21 - Cromatograma típico de extrato de caruru, sem saponificação.	85
Figura 22 - Cromatograma típico de extrato de goiaba.	94
Figura 23 - Cromatograma típico de extrato de manga.	99
Figura 24 - Cromatograma típico de extrato de tomate.	103
Figura 25 - Cromatograma típico de extrato de mamão comum.	109
Figura 26 - Cromatograma típico de extrato de mamão híbrido.	110
Figura 27 - Cromatograma: sementes de urucum - Filipinas.	124
Figura 28 - Cromatograma: pó de urucum - Peru	125

RESUMO

Extratos de 4 diferentes tipos de frutas e seus produtos processados, de 5 diferentes hortaliças folhosas e de sementes de urucum foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna C-18 com acetonitrila/clorofórmio 92:8 como fase móvel.

As provitaminas A e os carotenóides majoritários foram quantificados através dos métodos de padronização externa e de adição de padrão. Os resultados obtidos foram equivalentes, com uma precisão ligeiramente maior no caso da padronização externa.

O emprego de CLAE não mostrou ser vantajoso no caso da determinação dos carotenóides totais do urucum e o método da adição de padrão deve ser utilizado com restrições, sendo recomendado apenas para extratos não saponificados de folhas. Para os demais extratos, a padronização externa deve ser o método de escolha. No entanto, esta técnica requer purificação e manutenção de carotenóides padrões, uma tarefa difícil, considerando a diversidade dos carotenóides e sua susceptibilidade à degradação.

ABSTRACT

Extracts from 4 different kinds of fruits and their processed products, from 5 different leafy vegetables and from annatto seeds were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) on a C-18 column with acetonitrile/chloroform 92:8 as mobile phase.

The provitamins and major carotenoids were quantified by means of external standardization and standard addition methods. Results showed the two techniques to be equivalent, but external standardization was a little more precise.

The use of HPLC demonstrated no advantage in the quantitation of total annatto carotenoids. The standard addition method should be used with restrictions, being suitable only for unsaponified leaf extracts. For all the other samples, the external standardization should be the method of choice. This technique, however, requires the purification and maintenance of carotenoid standards, a difficult task considering the diversity of carotenoids and their susceptibility to degradation.

1 - INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos de natureza tetraterpênica, presentes não só no reino vegetal, mas também no animal. Dos mais de 600 carotenóides, cujas estruturas já foram elucidadas, apenas 50 ou 60 podem, teoricamente, ser convertidos em vitamina A (Rodriguez-Amaya, 1985).

Ao lado dessa atividade provitamínica, os carotenóides mostraram ser capazes de inibir a carcinogênese, conforme estudos epidemiológicos, que demonstram uma relação inversa entre o consumo de certas frutas e hortaliças e o risco de contrair câncer (Peto et al., 1981; Shekelle et al., 1985).

Devido às suas relevantes funções biológicas no ser humano, este importante grupo de pigmentos naturais vem sendo determinado, desde longa data, nos mais diferentes tipos de alimentos. Dúvidas quanto à confiabilidade dos resultados obtidos sempre têm surgido, visto a natureza, diversidade e complexidade dos procedimentos analíticos envolvidos.

Assim, o método da "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), 1990, apresenta resultados corretos do teor de provitamina A no caso de folhas verdes e tomate (Rodriguez-Amaya et al., 1988), sub- ou superestimando nas demais amostras.

A metodologia tradicional mais correta para a determinação desses pigmentos tem sido a cromatografia em coluna aberta, utilizando saponificação para amostras com alto teor de lipídios e/ou contendo

carotenóides esterificados, e eluição com gradiente de polaridade. Apesar dos bons resultados obtidos, críticas são feitas quanto à morosidade e à baixa sensibilidade e reprodutibilidade do procedimento por analistas inexperientes.

A partir da segunda metade da década de 70 surge um procedimento cromatográfico alternativo, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinação daqueles pigmentos.

O tempo total de análise é substancialmente reduzido, não ocorre exposição da amostra à luz ou ao oxigênio na etapa cromatográfica, não há retenção irreversível nem modificações dos componentes da amostra por conta de fases estacionárias demasiadamente ativas. Além da alta eficiência na separação, tanto de carotenos quanto de xantofilas, vantagens adicionais são dadas pelos altos níveis de precisão intralaboratorias alcançados.

Apesar de largamente empregada, a CLAE ainda não se tornou um método bem estabelecido e de uso rotineiro para a determinação dos carotenóides majoritários e de atividade provitamínica de frutas e hortaliças. Uma possível razão para tal fato reside nas grandes diferenças entre os dados obtidos na análise de amostras, utilizando inclusive a mesma técnica cromatográfica.

Assim, tomates apresentaram teores de beta-caroteno de 0,8 - 1,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Zakaria et al., 1979), 9,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Hsieh & Karel, 1983), 2,4 ou 6,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$, dependendo da origem (Bushway et al., 1986), e 1,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Speek et al., 1988).

Em pêssegos, a maior discrepância encontrada foi no teor de beta-criptoxantina: 0,03 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Bureau & Bushway, 1986), 2,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Ge-

bhardt et al., 1977) e $8,3 \pm 2,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Tavares, 1991). O fato poderia ser explicado pela não quantificação de ésteres de beta-criptoxantina, já que nos dois primeiros casos a amostra não sofreu saponificação prévia.

Em folhas, os dados mais surpreendentes são os apresentados por Speek et al. (1988). Das 33 amostras de hortaliças folhosas, 28 apresentaram teores de beta-caroteno inferior a 15% do teor total de carotenóides, sendo que em 20 amostras esse teor era inferior a 10%. As 16 amostras de hortaliças folhosas analisadas em São Paulo nunca apresentaram teores de beta-caroteno inferiores a 24% (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987; Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1990).

Apesar de certo grau de variabilidade inerente entre amostras do mesmo alimento ser esperado e poder explicar, pelo menos em parte, as diferenças observadas, a magnitude dessas variações apontam para o envolvimento de discrepâncias resultantes de metodologia analítica.

Por essa razão, o presente trabalho foi executado visando, principalmente, avaliar a quantificação por CLAE de provitaminas A e carotenóides majoritários em um número substancial de amostras: goiaba, mamão, tomate, manga e seus produtos processados, 5 hortaliças folhosas (caruru, beldroega, taioba, caruru-Alagoas e ora-pro-nobis), além de 12 amostras de sementes de urucum.

A padronização interna é a técnica de quantificação usualmente recomendada tanto para cromatografia gasosa quanto para CLAE. No caso específico de carotenóides, no entanto, não existe ainda um padrão interno adequado para os vários tipos. O Sudan I tem sido empregado com sucesso na determinação de provitaminas, mas co-elui com dihidroxí-

ou polioxicarotenóides. A padronização externa deve ser realizada com alguma precaução, já que a injeção separada do padrão e da amostra pode resultar em erros devido a variações das condições cromatográficas de uma corrida para outra. A técnica da adição de padrão oferece as mesmas vantagens da padronização interna, sem necessitar, porém, de um padrão interno.

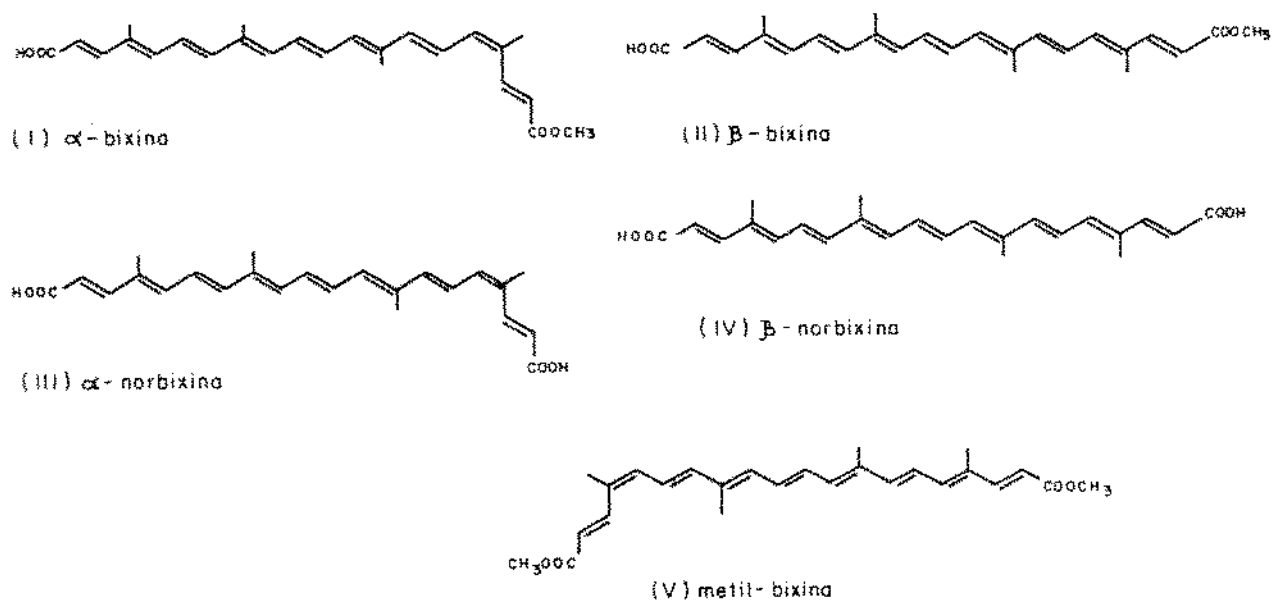
2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Carotenóides de Urucum

Tradicionalmente, os pigmentos das sementes do urucum, *Bixa orellana* L., são quantificados em conjunto, através de métodos espectrofotométricos após extração com solvente apropriado. Um processo desse tipo, desenvolvido pelo Tropical Development and Research Institute (TDRI) (Francis, 1970) ainda é empregado atualmente e se baseia no fato de que o pigmento vermelho da semente de urucum ser constituído de cerca de 90% de bixina (metil hidrogênio 9'-cis- 6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (I)) e uma pequena percentagem de outros pigmentos vermelhos quimicamente relacionados. Durante a extração das sementes, em temperatura elevada, ocorre degradação térmica e o teor de pigmentos amarelos aumenta às expensas dos vermelhos. Por isso, o método utiliza extração das sementes recém colhidas com clorofórmio a frio, seguida de leitura em espectrofotômetro de alíquota diluída, utilizando-se $A^{1\%}$ de 2826, a 500nm.

Métodos utilizando cromatografia em camada delgada (TLC) também foram testados. Placas de celulose (Reith & Gielen, 1971) desenvolvidas com ciclohexano/clorofórmio/ácido acético 65:5:1 foram capazes de promover a separação de alfa- e beta-bixina (metil hidrogênio 6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (II)) que, após dessorção da placa, foram quantificados por espectrofotometria, usando-se 505nm para alfa-bixina e 509nm para beta-bixina e valores de $A^{1\%}$ de 2790 e 2970 em clo-

roformio, respectivamente. Analisando preparações de urucum utilizadas para realçar a cor de manteigas, os autores encontraram teores de pigmentos totais de 0,250 à 0,687% (p/p) e a composição dos diferentes pigmentos foi de 12 - 59% de alfa-bixina e de 4 - 19% de beta-bixina. No caso de corantes para queijo, os mesmos autores utilizaram placas de sílica gel e clorofórmio/etanol(absoluto)/ácido acético 68:2:1 como eluente. Após a extração, a alfa-norbixina (9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dióico (III)) foi quantificada a 503nm com $A^{1\%}$ de 2290. Analisando quatro amostras de corantes para queijos, os autores encontraram teores de alfa-norbixina de 0,290 a 1,03% (p/p) ao lado de teores de pigmentos vermelhos de 0,372 a 1,20% (p/p).



Estudos em TLC bidimensional (Tirimanna, 1981), utilizando placas de sílica gel mostraram que, além dos dois carotenóides majoritários, bixina e norbixina, ocorriam também beta-caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e metil-bixina (dimetil 9-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (V)), além de outros carotenóides não identificados.

Bixina e norbixina puderam ser separadas em coluna de fase reversa (Simpson et al., 1991), utilizando-se como coluna uma pipeta de Pasteur acondicionada com partículas de 50µm de C-18 e aplicando vácuo brando. A mistura de acetonitrila/água 50:50 reteve a bixina, mas permitiu à norbixina mover-se lentamente na coluna, formando uma banda separada. Quando mudou-se a proporção para 60:40, a bixina foi então eluída. Menos de 20ml de solvente foram gastos para separação e eluição dos dois componentes e, após sua evaporação sob vácuo, os pigmentos foram retomados em CHCl₃ e lidos em espectrofotômetro.

Este método de microcoluna apresenta algumas vantagens sobre outros que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O custo do espectrofotômetro é menor, além de ser de uso comum em qualquer laboratório. Também, os solventes empregados não necessitam ser ultrapuros, nem tampouco precisam ser previamente filtrados e degasados.

Os pigmentos da cúrcuma e do urucum puderam ser separados através de técnica de CLAE em coluna de C-18, utilizando como fase móvel um gradiente de água/tetrahidrofurano (Rouseff, 1986). Além de bixina e norbixina, foram separados e identificados a curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina.

Uma publicação acerca dos métodos de determinação dos pigmentos bixinóides em sementes de urucum e seus derivados (Wood, 1988) discute vários modos de separação e quantificação dos carotenóides do urucum, além de apresentar um processo desenvolvido no Natural Resources Institute (NRI), em Londres. Trata-se de CLAE em coluna de ODS-2, partículas de 5µm como fase estacionária e mistura de metanol e ácido

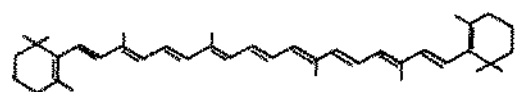
acético aquoso (2%) como fase móvel. A melhor resolução foi verificada com o uso da mistura 82:18, ainda que o tempo total de corrida fosse aumentado para trinta minutos. Apesar da absorção máxima se verificar a 470nm, preferiu-se utilizar 500nm, que corresponde grosseiramente à segunda absorção máxima de alfa-bixina e alfa-norbixina e com medidas a 430nm (máximo do composto amarelo C-17) para verificação da presença de produtos de degradação. Cromatogramas típicos são apresentados no apêndice.

Para quantificação dos pigmentos individuais, deve-se dispor dos padrões puros. Alfa-bixina com 90% de pureza é obtida por extração das sementes de urucum com solvente orgânico apropriado e o extrato resultante purificado por recristalizações sucessivas.

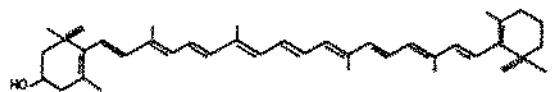
2.2 - Carotenóides de Hortaliças Folhosas

Carotenóides acumulam-se nos cloroplastos de todas as folhas verdes, devendo ser salientado o fato de que em todas as plantas examinadas encontra-se o mesmo perfil de carotenóides principais: beta-caroteno (β,β -caroteno (VI)), luteína ((3R,3'R,6'R)- β,ϵ -caroteno-3,3'-diol (VII)), violaxantina ((3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-5,6,5',6'-diepóxi-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -caroteno-3,3'-diol (VIII)) e neoxantina ((3S,5R,6R,3'S,5'R,6'S)-5',6'-epóxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -caroteno-3,5,3'-triol (IX)). Alfa-caroteno (6'R- β,β -carotene (X)), beta-criptoxantina ((3R)- β,β -caroteno-3-ol (XI)), zeaxantina ((3R,3'R)- β,β -caroteno-3,3'-diol (XII)), anteraxantina ((3S,5R,6S,3'R)-5,6-epóxi-5,6-dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol (XIII)) e

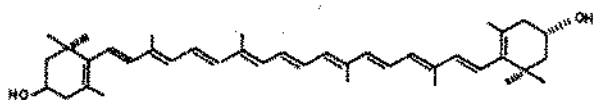
luteína-5,6-epóxido ((3S,5R,6S,3'R,6'R)-5,6-epóxido-5,6-dihidro- β , ϵ -caroteno-3,3'-diol (XIV)) frequentemente estão presentes, enquanto componentes minoritários (Goodwin & Britton, 1988). Exceto nas folhas senescentes do outono de algumas árvores de folhas caducas, as xantofilas encontram-se livres. Diferenças quantitativas entre espécies são observadas mas, no geral, carotenos (hidrocarbonetos) representam cerca de 25% e luteína, a principal xantofila, cerca de 45% do total de carotenóides presentes.



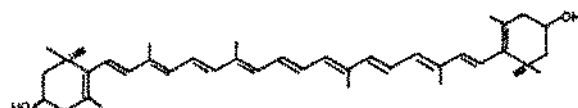
(VI) β -caroteno



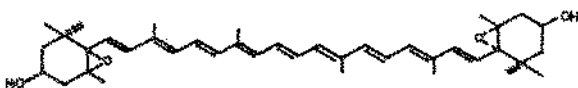
(XI) β -criptoxantina



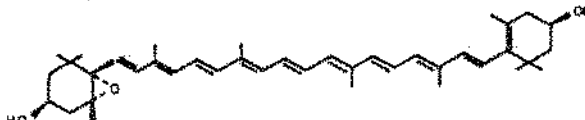
(VII) luteína



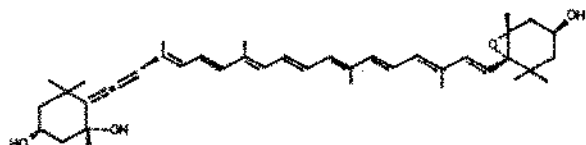
(XII) zeaxantina



(VIII) violaxantina



(XIII) antheroxantina



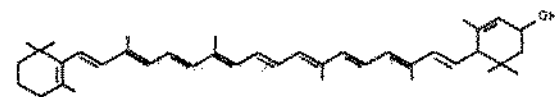
(IX) neoxantina



(XIV) toraxantina



(X) α -caroteno



(XV') α -criptoxantina

Através de técnicas de cromatografia em coluna convencional e espectrofotometria foram determinados os teores de alfa- e beta-carotenos em hortaliças folhosas cultivadas em São Paulo (Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1989). Na mostarda (*Brassica juncea* (L.) Czerr & Cross) os teores de alfa- e beta-caroteno encontrados foram de 0,58 e 60,45 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ respectivamente, enquanto que na couve chinesa (*Brassica chinensis*, L.) e taioba (*Xanthosoma sp.*) os teores encontrados foram de 0,04 e 13,41 e de 17,05 e 65,71 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente.

Utilizando igualmente a técnica de cromatografia em coluna convencional para separação dos diferentes constituintes e espectrofotometria no visível para sua quantificação, foi determinada a composição de hortaliças folhosas nativas (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1990). O estudo contemplou o caruru (*Amaranthus viridis*), o mentruz (*Lepidium pseudodydimum*), a taioba (*Xanthosoma sp.*), a serralha (*Sonchus oleraceus*) e a beldroega (*Portulaca oleracea*). Foram encontrados teores de carotenóides totais nas faixas de 347-468, 237-380, 225-361, 149-334 e 71-109 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente. Predominaram a luteína (54-61% luteína + violaxantina) e beta-caroteno (24-34%). Também foram encontrados 10 a 14% de neoxantina além de traços de zeaxantina e alfa-criptoxantina ((3R,6'R)- β , ϵ -caroten-3'-ol (XV')). As hortaliças folhosas nativas mostraram ser fontes mais ricas de provitamina A do que as folhosas exóticas, salsinha, rúcula, coentro, agrião, couve, almeirão, alface crespa e lisa, repolho e couve-chinesa (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987), o que justifica sua produção comercial.

2.3 - Carotenóides de Frutas

Os carotenóides de frutas se caracterizam por uma grande variedade de estruturas e, até a década de 70, aproximadamente 70 compostos foram descritos (Goodwin, 1980). Ao contrário do que ocorre nas folhas, as xantofilas existentes em frutos encontram-se majoritariamente esterificadas. Oito grupos principais de frutas podem ser distinguidos quanto às características dos pigmentos, apesar da ocasional superposição de um grupo com outro. A Tabela 1 relaciona esses grupos e fornece exemplos característicos (Davies, 1976).

As estruturas da -criptoxantina ((3R,6'R)- β , ϵ -caroten-3-ol (XV)), fitoflueno (15-cis-7,8,11,12,7',8'-hexahidro- ψ , ψ -caroteno (XVI)), zeta-caroteno (7,8,7',8'-tetrahidro- ψ , ψ -caroteno (XVII)), licopeno ((ψ , ψ -caroteno (XVIII)), gama-caroteno (β , ψ -caroteno (XIX)), mutatocromo (5,8-epóxi-5,8-dihidro- β , β -caroteno (XX)), licoxantina (ψ , ψ -caroten-16-ol (XXI)), licofila (ψ , ψ -caroteno-16,16'-diol (XXII)), prolicopeno ((7Z,9Z,7'Z,9'Z)- ψ , ψ -caroteno (XXIII)), semi-beta-carotenoona (5,6-sec- β , β -caroteno-5,6-dione (XXIV)) e diepóxi-beta-caroteno (5,6,5',6'-diepóxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -caroteno (XXV)) são mostradas a seguir.

De acordo com o perfil dos carotenóides constituintes, a manga e o tomate se encontram nos grupos IV e VI respectivamente. A goiaba e o mamão exótico devem ser enquadrados no grupo III, enquanto que o mamão comum (semi-selvagem) no grupo IV, conforme segue.

Tabela 1 - Distribuição dos carotenóides em grupos representativos de frutos

Nº do GRUPO	CARACTERÍSTICA DOS PIGMENTOS	REPRESENTANTE TÍPICO	CAROTENÓIDES PRINCIPAIS
I	Quantidade insignificante	<i>Pyracantha rogersiana</i>	---
II	Carotenóides cloroplásticos	<i>Cucurbita maxima</i>	1,2,5,6
III	Série do licopeno	<i>Diospyros kaki</i> ^A	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14
IV	Beta-caroteno e derivados	<i>Mangifera indica</i>	1,2,6,7,10,12,13,14,17
V	Epóxidos	<i>Crataegus pratensis</i>	1,12,17
VI	Pigmentos espécie específicos ^B	<i>Lycopersicon esculentum</i>	21,22
VII	Poli-cis derivados	<i>Arun maculatum</i>	23
VIII	Seco-e apocarotenóides ^B	<i>Murraya exotica</i>	25

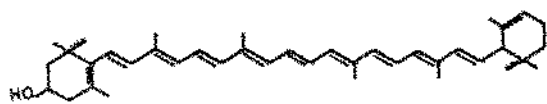
Pigmentos

- | | |
|-------------------------|--------------------------------|
| 1. Beta-caroteno (VI) | 11. Alfa-criptoxantina (XV) |
| 2. Luteína (VII) | 12. Beta-criptoxantina (XI) |
| 4. Neoxantina (IX) | 13. Antheraxantina (XIII) |
| 5. Alfa-caroteno (X) | 14. Violaxantina (VIII) |
| 6. Zeaxantina (XII) | 17. Mutatocromo (XX) |
| 7. Fitoflueno (XVI) | 21. Licoxantina (XXI) |
| 8. Zeta-caroteno (XVII) | 22. Licofila (XXII) |
| 9. Licopeno (XVIII) | 23. Prolicopeno (XXIII) |
| 10. Gama-caroteno (XIX) | 25. Semi-beta-carotenona (XXI) |

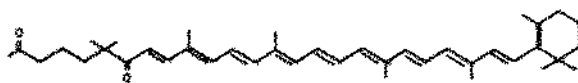
Referência: Davies, 1976

^A Também tem semelhança com padrão do tipo IV

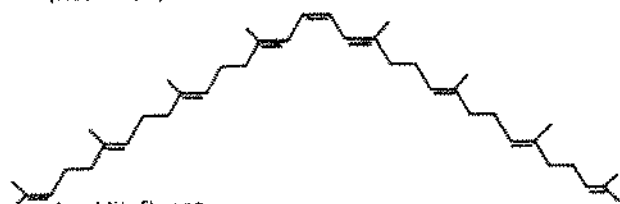
^B Citados somente os pigmentos específicos



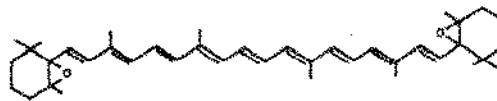
(XV) α -criptoxantina



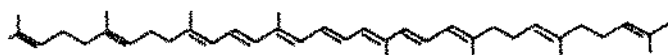
(XXIV) semi- β -carotenona



(XVI) fitoflueno



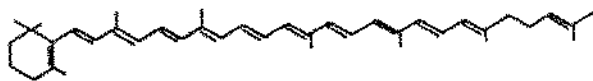
(XXV) diepoxi- β -caroteno



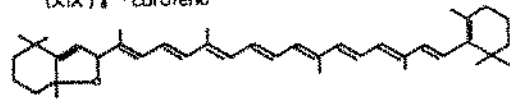
(XVII) zeta-caroteno



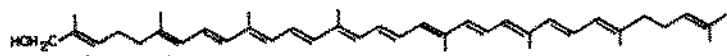
(XVIII) licopeno



(XIX) ϵ -caroteno



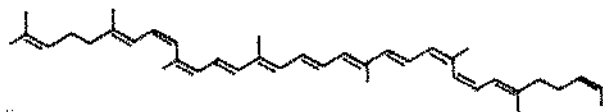
(XX) mutocromo



(XXI) licoxantina



(XXII) licofila



(XXIII) prolicopeno

2.3.1 - Goiaba

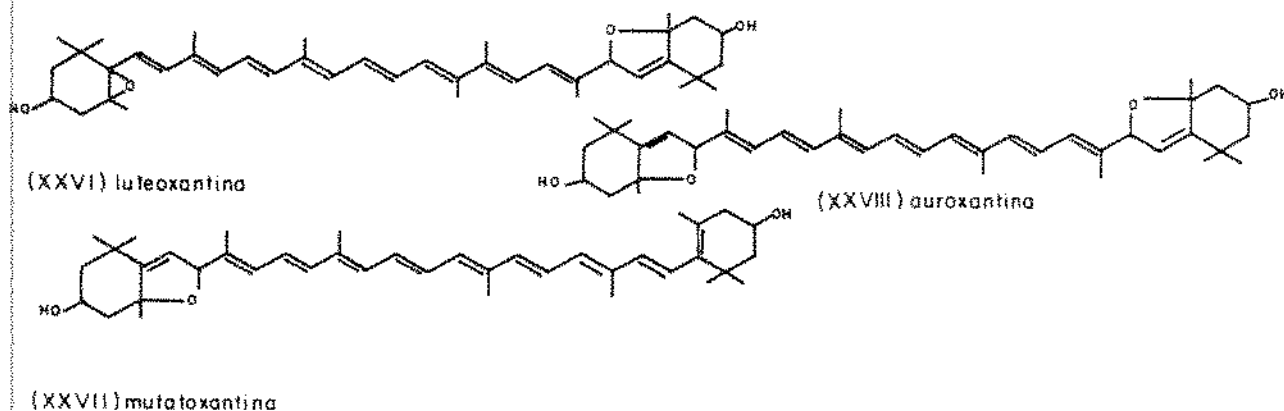
Apesar da goiaba (*Psidium guajava* L.) ser uma das frutas tropicais mais conhecidas e fartamente encontrada em todas as regiões do país, somente no início da década de 80 foi realizado um trabalho sistemático visando estabelecer a composição quali- e quantitativa dos carotenóides constituintes das goiabas nativas (Padula & Rodriguez-Amaya, 1986). Através de metodologia clássica de cromatografia em coluna con-

convencional, cromatografia em camada delgada e espectrofotometria foram identificados e eventualmente quantificados os carotenóides de goiabas da cultivar IAC 4 de Campinas, São Paulo, e de frutos provenientes do Ceará e Pernambuco, já que a maior parte do suco processado no país provém de goiabas cultivadas e processadas no Nordeste. O carotenóide mais abundante (80%) em todas as amostras analisadas foi o licopeno (trans), vindo a seguir o beta-caroteno (5 a 10%). Foram detectadas ainda pequenas quantidades de outros carotenóides como zeta-caroteno, gama-caroteno, zeinoxantina, cis-licopeno e diepoxi-beta-caroteno. Quanto às diferenças regionais, as goiabas do Nordeste apresentaram teores mais elevados de beta-caroteno quando comparadas às de São Paulo. O teor de licopeno de frutas de Pernambuco foi comparável com os teores encontrados na goiaba IAC 4, enquanto o de frutas do Ceará foi mais baixo.

2.3.2 - Manga

Fruta tropical apreciada por suas características aromáticas, a manga (*Mangifera indica* L.) tem experimentado um aumento de importância econômica em países em desenvolvimento. Ao lado do mercado doméstico, a crescente demanda de países de clima temperado para frutas frescas favoreceu o aumento da produção. Os maiores exportadores são o México, Filipinas, Índia, Paquistão e Brasil. Os dados disponíveis até 1986 sobre a composição dos carotenóides de mangas aqui cultivadas são muito contraditórios, refletindo não somente a grande variabilidade dos frutos estudados, mas principalmente o uso de metodologias inadequadas que não separavam os carotenos ou carotenóides individuais. Utilizando

a técnica prescrita por Rodriguez et al. (1976) adaptada à análise de amostras de mangas (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1987), a composição quali- e quantitativa dos carotenóides das cinco cultivares de manga mais comercializadas no Estado de São Paulo foi estabelecida (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1989). Apesar das pequenas diferenças qualitativas observadas, a maior diferença entre cultivares está na composição quantitativa. O beta-caroteno é o carotenóide majoritário, respondendo por 48-84% do total, enquanto os epoxicarotenóis violaxantina, luteoxantina (5,6,5',8'-diepóxi-5,6,5',8'-tetrahidro- β,β caroteno-3,3'-diol (XXVI)) e mutatoxantina (5,8-epóxi-5,8-dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol (XXVII)) em conjunto alcançam 13-49%. Outros carotenóides detectados foram zeta-caroteno, mutatocromo, alfa-criptoxantina e auroxantina (5,8,5',8'-diepóxi-5,8,5',8'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,3'-diol (XXVIII)).

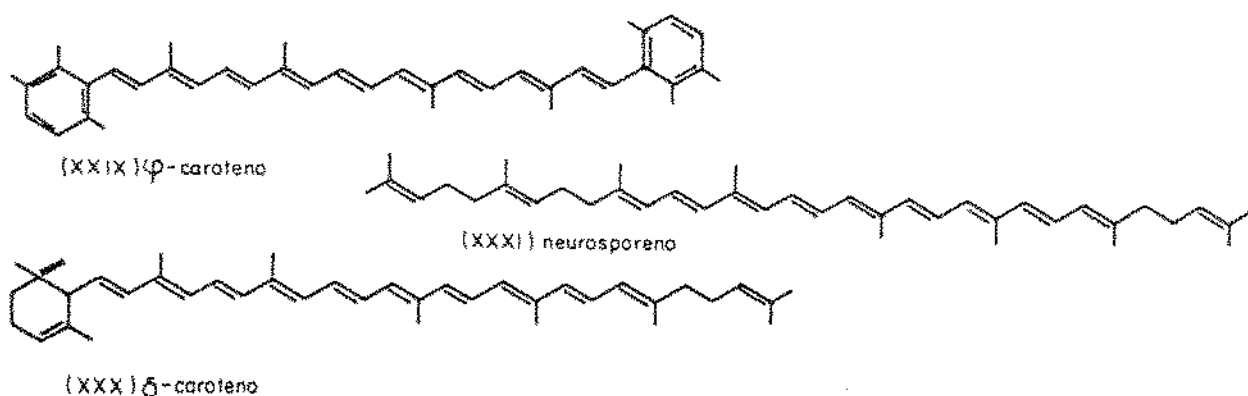


A cultivar Extrema mostrou os teores mais elevados tanto de beta-caroteno quanto de carotenóides totais (2545 e 3045ug/100g, respectivamente), enquanto a cultivar Haden forneceu os níveis mais baixos (661 e 1387ug/100g, respectivamente).

2.3.3 - Tomate

Data do final da década de 70 a primeira publicação sobre a determinação dos carotenóides e atividade provitamínica A de tomates, utilizando CLAE em fase reversa (Zakaria & Simpson, 1979). Para remoção de material lipídico indesejável e que poderia interferir com o comportamento cromatográfico dos compostos de interesse, foi feita a saponificação dos extratos originais. Os extratos saponificados foram colocados então em congelador durante uma noite a -10°C a fim de possibilitar a precipitação dos esteróis e, somente então, injetados na coluna de Partisil-FXS-5/ODS. Como fase móvel foram utilizadas diferentes misturas de clorofórmio em acetonitrila. Os picos cromatográficos de beta-caroteno e licopeno foram quantificados usando o método da calibração externa, encontrando-se os seguintes valores (média de cinco amostras): licopeno, $9,781$ e beta-caroteno, $1,140\mu\text{g.g}^{-1}$.

Partindo da premissa de que a característica de qualidade mais importante em tomate é a sua coloração, foi determinada a composição dos pigmentos individuais em cubos de tomate congelado (Urbányi & Horti, 1989). Os pigmentos foram extraídos com acetona/hexano e aplicados à coluna de óxido de magnésio - diatomita sem saponificação prévia. Os carotenóides eluídos foram quantificados por espectrofotometria. Utilizaram-se tomates com três distintos graus de amadurecimento que mostraram, no tempo de armazenamento zero, teores similares de alfa-caroteno, beta-caroteno, zeta-caroteno, phi-caroteno (φ, φ -caroteno (XXIX)), prolicopeno e delta-caroteno ($(\delta\text{R})-\epsilon, \psi$ -caroteno (XXX)). Os teores de gama-caroteno e neurosporeno (7,8-dihidro- ψ, ψ -caroteno (XXXI)), ao contrário, dobravam a cada grau de amadurecimento.



Os tomates do terceiro grau de amadurecimento apresentaram a seguinte composição em carotenóides no tempo zero: alfa-caroteno, 2,724; beta-caroteno, 3,480 (3,19%); zeta-caroteno, 2,884; phi-caroteno, 4,692; prolicopeno, 3,788; delta-caroteno, 2,008; gama-caroteno, 34,888 (32,01%); neurosporeno, 24,896 (22,84%) e licopeno, 29,484 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (27,05%), totalizando 109,004 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Amostras de tomates com diferentes graus de amadurecimento também foram analisadas quanto à sua composição em carotenóides através de técnica de CLAE em fase reversa e utilizando dois sistemas de solventes (Daood et al., 1987). As amostras foram extraídas com tetracloreto de carbono/metanol 2:1 e, após remoção da fase aquosa, levou-se à secura. Os pigmentos secos foram retomados em 10ml de mistura de clorofórmio/ fase móvel 1:1 e imediatamente injetados no cromatógrafo operando com coluna Chromsil C-18 10 μm , 250 x 4,6mm. Como fase móvel foram utilizados acetona/água 9:1 (F1) e acetonitrila/isopropanol/água 200:288:13 (F2) de modo isocrático, conseguindo-se boa separação dos diferentes componentes, mesmo sem saponificação prévia do material. O emprego de acetona mostrou ser prejudicial, já que 200 corridas inutilizavam a coluna. Além disso, o uso da fase F2 não mostrou quaisquer

produtos de oxidação ou isomerização que apareciam nos cromatogramas na eluição com acetona, na forma de pequenos picos não identificados. A proporção dos diferentes carotenóides mostrou ser diferente, conforme a variedade do tomate e o grau de amadurecimento, como se observa na Tabela 2.

Assim, licopeno, beta-caroteno e luteína constituem cerca de 76, 12,9 e 3,5%, respectivamente, em tomates supermaduros, enquanto componentes minoritários representam 3 a 5% do total de pigmentos. Os frutos maduros vermelhos, além dos pigmentos acima citados, contêm neurosporeno (29%) e zeta-caroteno (3,6%) como componentes majoritários, e seu baixo teor nos frutos muito maduros se deve à contínua interconversão desses intermediários a licopeno e beta-caroteno. Nos frutos maduros amarelos neurosporeno e outros carotenos são os pigmentos majoritários, enquanto a luteína é a xantofila mais representada.

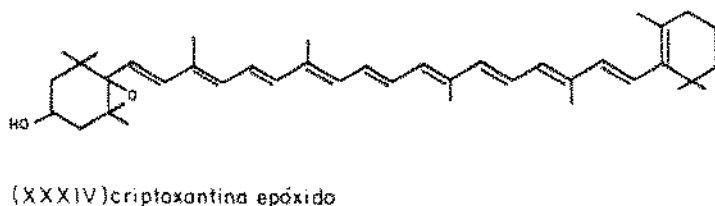
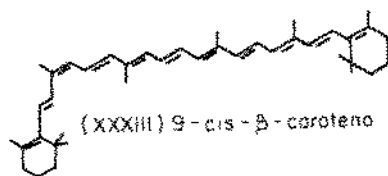
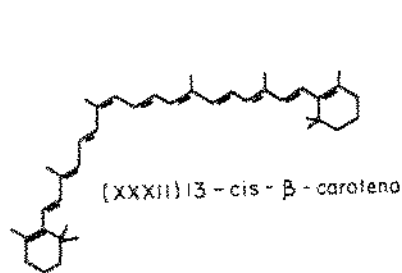
Tomates cultivados no Estado de São Paulo foram igualmente objeto de estudo visando determinação da composição dos carotenóides (Tavares, 1991). A metodologia utilizada foi a recomendada por Rodriguez et al. (1976) para separação e quantificação dos carotenóides individuais. Licopeno, beta-caroteno e fitoflueno constituíram 71,38, 14,56 e 10,76%, respectivamente, enquanto a soma dos dois componentes minoritários (zeta-e gama-caroteno) alcançou apenas 3,31% do total de carotenóides ($34,77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). O estudo contemplou também produtos processados como purê, extrato, catchup e suco de tomate onde, uma vez quantificada, a fração de beta-caroteno foi analisada quanto aos teores relativos do isômero trans e dos isômeros mono-cis do beta-caroteno: 13-cis- β,β -caroteno (XXXII) e 9-cis- β,β -caroteno (XXXIII).

Tabela 2 - Pigmentos de tomate em diferentes graus de amadurecimento

PIGMENTOS	PROPOÇÃO DE CADA PIGMENTO %		
	MADURO AMARELO	MADURO VERMELHO	MUITO MADURO VERMELHO
CLOROFILA	7.79	3.41	3.36
LUTEÍNA	7.23	1.90	4.02
NEOXANTINA	0.07	0.66	—
XANTOFILA VIOLETA	—	2.10	0.53
PROLICOPENO	0.33	1.04	1.43
LICOPENO	24.9	50	75.8
NEUROSPORENO	25.1	29	—
BETA-CAROTENO	15.4	7.90	12.86
ZETA-CAROTENO	18.08	3.60	a

Referência: Urbanyi & Hort, 1989

a - Não detectado na concentração usada



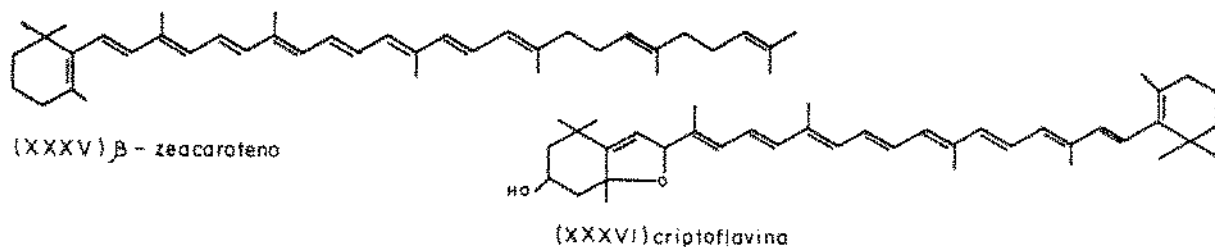
2.3.4 - Mamão

Nativo da América tropical, o mamão (*Carica papaya* L.) espalhou-se por todas as regiões tropicais da terra, sendo o Brasil, México, Peru, Venezuela e Filipinas os maiores produtores. É encontrado em qualquer época do ano e consegue larga aceitabilidade, tanto por parte de crianças quanto de adultos.

Num estudo recente (Philip & Chen, 1988), foi possível separar os ésteres de carotenóides de mamão de cultivar não especificada, através CLAE. Os carotenóides foram previamente separados em três frações em coluna de alumina e cada fração submetida a CLAE em fase reversa. A composição (dada como equivalentes de beta-caroteno em $\mu\text{g.g}^{-1}$) de β-criptoxantina, anteraxantina e β-criptoxantina epóxido (5,6-epóxi-5,6-dihidro-β,β-caroten-3-ol (XXXIV)) totais encontrada foi de 7,48, 1,87 e 8,08 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, sem contar uma mistura de -criptoxantina e anteraxantina que chegou a 1,44 $\mu\text{g.g}^{-1}$. O teor de beta-caroteno foi de 0,71 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e o de carotenóides totais, também calculado como equivalente de beta-caroteno, igual a 25 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Apesar de ser amplamente reconhecido que variações na composição de carotenóides de frutas ocorrem como consequência de fatores

tais como diferenças de cultivares, condições climáticas, etc., tais efeitos raramente foram quantificados. Uma exceção é a importante contribuição de Kimura et al., 1991 no estudo da influência dos fatores acima mencionados sobre a composição das quatro cultivares de mamão mais comercializadas no Estado de São Paulo. A cultivar comum, semi-selvagem, de polpa alaranjada, tem beta-criptoxantina como componente principal, representando 62% dos carotenóides totais, e não possui licopeno. Nas outras cultivares todas de polpa vermelha, o licopeno predomina, respondendo por 61, 56 e 66% do total nos mamões Solo, Formosa e Tailândia, respectivamente. Beta-zeacaroteno (7',8'-dihidro- β , ψ -caroteno (XXXV)) e criptoflavina (5,8-epoxi-5,8-dihidro- β , β -caroten-3-ol (XXXVI)) somente foram encontrados na cultivar nativa, enquanto gama-caroteno foi encontrado em mamão Solo. A anteraxantina aparece em todas as cultivares de polpa vermelha.



Quanto às variações devido a fatores geográficos, verificou-se que todas as amostras de mamão Formosa cultivadas na Bahia, onde o clima é mais quente que São Paulo, têm teores mais elevados de beta-caroteno (6,1 vs 1,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$), beta-criptoxantina (8,6 vs 5,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e licopeno (26,5 vs 19,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$), mas teores mais baixos de beta-criptoxantina epóxido (1,8 vs 3,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostragem e Preparo de Amostras.

Amostras de frutos foram adquiridos no CEASA (Centrais de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro), no Mercado Municipal de Petrópolis, na feira livre de Duque de Caxias, no Mercado de Madureira, e no Hortomercado de Campo Grande, todos do Estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 1989 a maio de 1990, de modo a ter-se 6 lotes de 10 goiabas maduras, 8 lotes de 5 mangas grandes maduras (espada, julietta, carlota, pêssago, rosa, coração de boi, bahia e sapucaia) e 5 lotes de 10 frutos pequenos maduros (carlotinha, espadinha, querosene e sapucaia), 6 lotes de 10 tomates maduros, 7 lotes de 3 mamões grandes maduros e 7 lotes de 5 frutos pequenos não maduros, totalizando 39 amostras. As frutas de cada lote foram selecionadas ao acaso.

Os frutos íntegros de cada lote de tomate e goiaba foram divididos longitudinalmente em 4 pedaços, os lados opostos reunidos e homogeneizados. Cada lote de manga foi descascado e, após a retirada do caroço, a polpa foi reunida e homogeneizada. Os mamões foram descascados, divididos longitudinalmente em 4 pedaços, os caroços afastados, os lados opostos reunidos e homogeneizados. A homogeneização das amostras de frutos foi realizada em liquidificador "Waring Blendor", modelo 7012 e utilizadas porções de cerca de 25g de homogeneizado para extração posterior.

As amostras de produtos processados de frutos foram adquiridas no comércio local de Campo Grande e Barra da Tijuca, à mesma época dos frutos, formando-se sempre lotes de 3 unidades (lata, garrafa, pacote, vidro, frasco) sendo 1 de manga em calda, 1 de "mango chutney" e 2 de suco de manga; 3 de extrato de tomate, 2 de pure, 2 de catchup e 2 de suco; 3 de goiaba em calda, 4 de geléia, 3 de doce em massa e 2 de suco; 3 de mamão maduro cristalizado e 1 de doce de mamão verde, perfazendo 28 amostras.

O conteúdo das 3 unidades correspondentes a cada lote foi retirado da embalagem, reunido e homogeneizado em "Waring Blendor", eventualmente com adição de água. Do homogeneizado foi retirada amostra para posterior extração, sendo aproximadamente 5g de mamão maduro cristalizado, 10g de produtos concentrados de tomate e 25g dos demais.

Amostras de hortaliças folhosas foram adquiridas no Mercado Municipal de Petrópolis, sendo cada lote constituído de 5 amarrados de caruru verde (*Amaranthus viridis* L.) taioba ou mangarito (*Xanthosoma sagittifolium* (L.), Schott.) (Correa, 1978) e de beldroega pequena (*Portulaca oleracea* L.).

Amostras de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) (Correa, 1978) e de caruru (Alagoas), provavelmente beldroega da praia (*Sesuvium portulacastrum* L.) (Correa, 1926), foram obtidas de plantas crescendo em estado semi-selvagem nos jardins do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos CTAA/RJ, sendo cada lote constituído de cerca de 500g de folhas verdes, frescas, colhidas ao acaso.

Após lavagem superficial com água e secagem com papel absorvente, as folhas foram cortadas em tiras finas e curtas, misturadas en-

tre si e, em seguida, pesadas em porções de aproximadamente 5g para extração posterior.

Doze amostras diferentes de sementes de urucum, provenientes da região Norte do Estado do Rio de Janeiro, foram submetidas ao quarteamento até que cada amostra tivesse sido reduzida a cerca de 25g. Pesou-se, então, em torno de 5g (em duplicata) de cada amostra, para posterior extração.

O restante foi novamente quarteado até que a amostra estivesse reduzida a cerca de 5g; retirou-se cerca de 2g de material e reduziu-se em micro-moinho Janke e Kunkel tipo A-10, IKA-Werk ou em moinho de bolas MLW tipo KM1 VEB-Metallverarbeitung, com esferas de aço inox. Do pó resultante pesou-se em torno de 0,1 g (em duplicata) para posterior extração.

3.2. Análise da Matéria-prima

As amostras de frutos e produtos processados foram previamente analisadas quanto ao teor de umidade, acidez e sólidos solúveis. As determinações foram realizadas de acordo com metodologia preconizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP (Angelucci et al., 1984). Assim, a acidez total foi determinada mediante titulação da amostra com solução padronizada de hidróxido de sódio, utilizando-se fenolftaleína como indicador e expressando o resultado em ml de NaOH 1N/100 g de amostra.

O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria a 20°C, com leitura direta do °Brix quando a acidez total da amostra

era inferior a 1%, ou com correção da leitura em função da acidez total, mediante uso de tabela.

Para determinação da umidade das amostras de alto teor de água, pesou-se analiticamente 10g (em duplicata) em cápsula de porcelana contendo areia e pistilo, previamente tarada, e levou-se a peso constante em estufa a 70°C, sob vácuo.

Das amostras de baixo teor de água pesou-se analiticamente 5g (em duplicata) em cápsula previamente tarada, levando-se a seguir a peso constante em estufa a 70°C, sob vácuo.

As amostras de hortaliças folhosas e de sementes de urucum foram igualmente analisadas quanto ao teor de umidade. Em ambos os casos pesou-se analiticamente, em duplicata, 2g de amostra finamente pulverizada em peneira e levou-se a peso constante em estufa a 100°C.

3.3. Determinação de Carotenóides

3.3.1. Etapas pré-cromatográficas: extração de carotenóides

3.3.1.1 - Cuidados preliminares

Trabalhou-se em laboratório onde não havia incidência direta de luz solar, em ambiente de luz indireta e de baixa intensidade. Quando não se dispunha de vidraria própria (low actinic red, Pyrex ou similar), os diferentes frascos de manipulação foram protegidos por folhas de papel alumínio, incluindo o balão de evaporação e principalmente as colunas de MgO para isolamento de componentes.

Para extração dos carotenóides utilizou-se o homogeneizador-liquidificador Waring Blendor, modelo 7012, com copos de aço inox de 37, 110 e 250 ml.

Para a evaporação de solventes (ou concentração de extratos) utilizou-se um evaporador rotativo Büchi modelo RE111 acoplado a banho-maria Büchi 461, operando em temperaturas em torno de 40°C.

Os extratos hexânicos concentrados foram transferidos para frascos de soro tipo Wheaton 400 de 5,10 ou 30ml de capacidade, conforme o caso, lacrados sob corrente de nitrogênio e guardados em freezer a -15°C (quando a injeção imediata em cromatógrafo era impossível ou desaconselhada).

A maior parte do hexano utilizada foi purificado no próprio laboratório, através do tratamento do produto recuperado com sódio metálico e posterior destilação em Aparelho de destilação fracionada modelo 5902, Normschliff Geraetebau - Wertheim.

Esse equipamento também foi utilizado para destilação do clorofórmio recuperado, tendo-se sempre o cuidado de adicionar um estabilizante (EtOH 0,5-1,0%) ao produto recém destilado.

Os solventes utilizados - metanol, etanol, acetona, clorofórmio e hexano - tinham alto grau de pureza e garantia de qualidade. Empregou-se cloreto de sódio e sulfato de sódio anidro para análise, ACS, ISO, Merck.

3.3.1.2 - Extração de frutas

Para extração dos carotenóides de frutas seguiu-se, em linhas gerais, a metodologia para este tipo de análise (Davies, 1976; Simpson et al., 1987), com modificações para assegurar a completa remoção dos pigmentos:

- As amostras foram tratadas com porções sucessivas de 40ml de eta-

nol/hexano 1:1 em Waring Blendor até completa extração.

- Após cada extração filtrou-se em funil com placa de vidro sinterizado e os carotenóides da fase líquida foram transferidos para uma ampola de decantação contendo 25ml hexano/20ml água. Agitou-se, lentamente, durante 30 a 60 segundos e deixou-se em repouso até a separação das camadas (caso a fase aquosa apresentasse coloração amarela, adicionava-se acetona ou solução aquosa a 5% de sulfato de sódio, aos poucos, pelas paredes da ampola, de modo a transferir os pigmentos para fase hexânica e evitar formação de emulsão).

- A fase aquosa foi recolhida para uma segunda ampola de decantação e reextraída com porções de 40ml de etanol/hexano por 2 ou 3 vezes e o extrato hexânico resultante adicionado à primeira ampola de decantação.

- Os extratos hexânicos reunidos foram lavados com 100ml de água, 2 ou 3 vezes, adicionando-se cloreto de sódio à medida em que o solvente foi sendo removido.

- O extrato hexânico lavado foi adicionado de sulfato de sódio anidro e após 20 minutos, o extrato seco foi concentrado em evaporador rotativo até volume de 25ml.

Neste ponto os extratos de tomate e de goiaba encontravam-se prontos para a análise cromatográfica, enquanto que os extratos de maçã e de manga foram submetidos à saponificação e posterior transferência para hexano:

- Volumes iguais de extrato hexânico e de hidróxido de potássio 10% em metanol foram colocados em balão de fundo redondo e aquecidos, sob refluxo, durante 5 a 15 minutos.

- A mistura alcalina foi resfriada e porções sucessivas foram transfe-

ridas para ampola de decantação contendo igual volume de hexano. Adicionou-se água lentamente, sem agitação, descartando-se a fase aquosa, quando incolor (para evitar perda de pigmentos, particionados entre as duas fases durante a retirada do álcali, adicionou-se acetona ao hidróxido de potássio metanólico e utilizou-se sempre pequenas alíquotas do extrato; cloreto de sódio foi adicionado para quebrar emulsões eventualmente formadas).

- O extrato hexânico foi lavado com água, secado com sulfato de sódio anidro, concentrado e levado a volume de 25ml, conforme descrito anteriormente.

Todo procedimento encontra-se esquematizado na Figura 1.

3.3.1.3 - Ação de diferentes solventes na extração

Dez diferentes solventes (ou sistemas de) foram testados para verificação de sua eficácia na extração dos pigmentos de goiaba e mamão. As amostras de goiaba (frutos inteiros) e mamão (polpa), 200g de cada, foram cortadas em pedaços de 3cm de comprimento por 1cm de espessura e a seguir submetidas ao branqueamento, mediante imersão durante 3 minutos em água em ebulição (Rangarath & Dubash, 1981).

Homogeneizou-se, e porções de 5g foram utilizadas para cada extração, realizada de modo análogo ao já descrito, utilizando-se em todos os casos apenas 5 porções do solvente escolhido. No caso dos 5 primeiros solventes fez-se também extração seguida de transferência imediata para hexano.

Os solventes ensaiados foram:

- metanol (Lichtenthaler, 1987; Bowles et al., 1985)

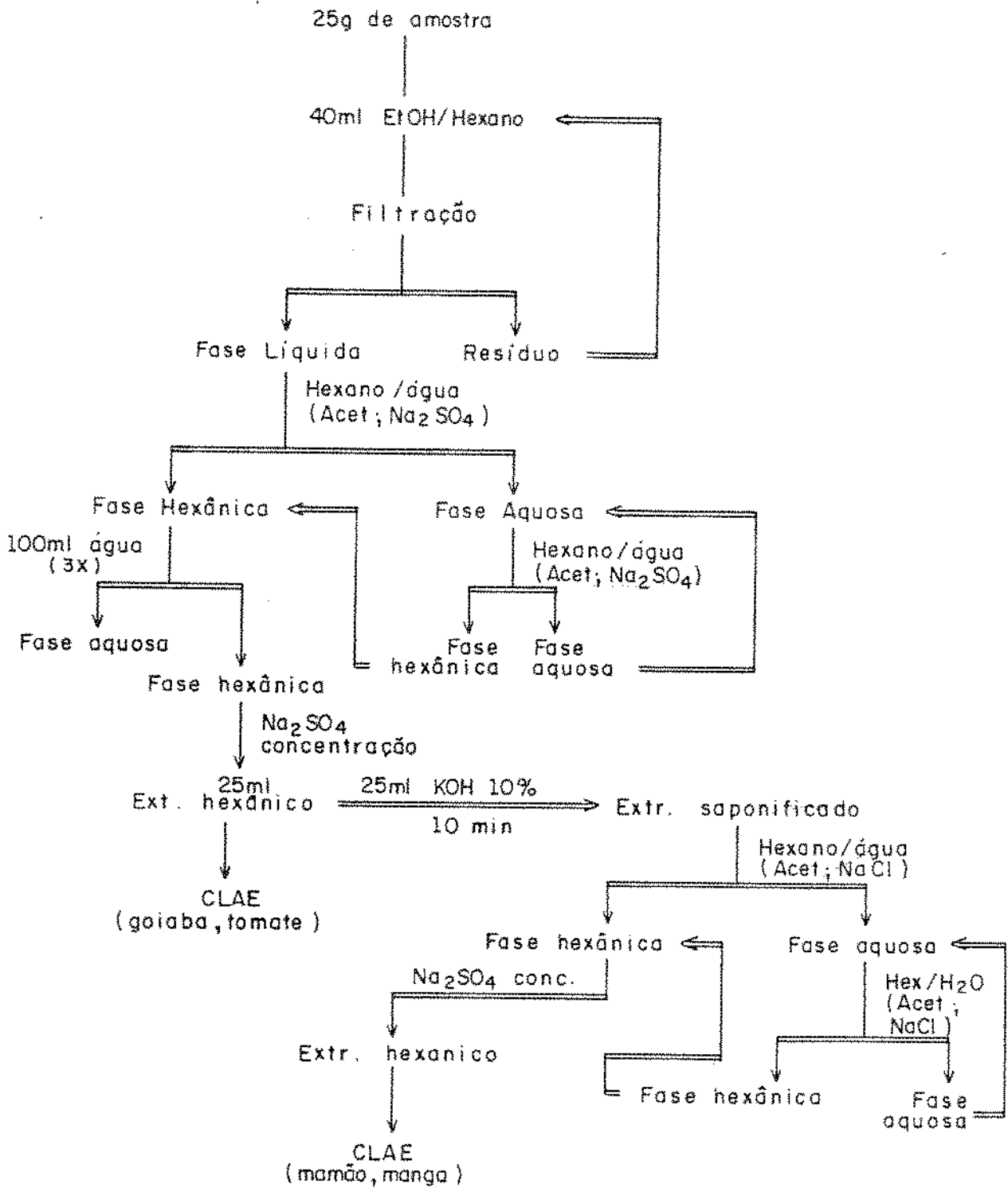


Figura 1 - Representação esquemática da extração de frutas

- etanol (Braumann & Grimme, 1981; Lichtenthaler, 1987)
- acetona (Bowles et al., 1985; Lichtenthaler, 1987; Braumann & Grimme, 1981)
- acetona/metanol 1:1 (Bowles et al., 1985)
- acetona/etanol 1:1
- metanol/hexano 1:1
- etanol/hexano 1:1
- acetona/hexano 1:1 (Hsieh & Karel, 1983; Al-Khalifa & Simpson, 1988)
- metanol/acetona/hexano 1:1:2
- etanol/acetona/hexano 1:1:2

Os solventes acima mencionados foram utilizados em trabalhos recentes envolvendo CLAE e anteriormente em cromatografia em coluna aberta (Davies, 1976). A Figura 2 ilustra o procedimento utilizado.

O teor de carotenóides totais nos extratos foi determinado, injetando-se 10ul do extrato no cromatógrafo operando com coluna RadialPack C-18, 10cm de comprimento e diâmetro interno de 5mm, empregando metanol/clorofórmio 75:25 como fase móvel. A área total dos cromatogramas obtidos foi comparada com as áreas de uma curva padrão de beta-caroteno (all-trans, Sigma Chemical Co.) sem purificação prévia.

3.3.1.4 - Extração de produtos processados de frutas

Produtos processados, com baixo teor de açúcar, foram extraídos conforme descrito em 3.3.1.2, enquanto que os produtos processados contendo alto teor de açúcar exigiram adição de quantidades de água ou solução de NaCl 10%. Homogeneizou-se durante 3 minutos em Waring Blendor e filtrou-se sob vácuo. O resíduo foi submetido à extração com eta-

nol/hexano e o filtrado recolhido em ampola de decantação, adicionado de etanol/hexano, agitado manualmente por alguns minutos e deixado em repouso. A fase superior foi juntada ao extrato hexânico do resíduo, enquanto que a fase inferior foi submetida a extrações sucessivas com etanol/hexano. A Figura 3 ilustra o procedimento utilizado.

3.3.1.5 - Extração de hortaliças folhosas

Para a extração dos pigmentos de hortaliças folhosas utilizou-se como solvente a mistura etanol/acetona 1:1 a quente, que tinha mostrado bons resultados na extração de alguns grupos de algas e certos tipos de fungos (Davies, 1976).

Três a quatro extrações sucessivas com 40ml do solvente em Waring Blendor durante 30 segundos (de cada vez) foram suficientes para extrair completamente 5g de amostra. Os extratos foram recolhidos para ampola de decantação contendo hexano (acetona)/água (NaCl), a fase aquosa recolhida para uma segunda ampola de decantação contendo hexano (acetona)/água (NaCl) e reextraída até remoção completa dos pigmentos. As frações hexânicas foram reunidas, lavadas com água, sécadas com sulfato de sódio anidro, transferiu-das para balão volumétrico de 500ml e o volume completado.

Uma alíquota de 250ml foi concentrada em rotaevaporador e o resíduo retomado com hexano e levado a 5ml; uma segunda alíquota de 250ml foi concentrada, saponificada com solução de KOH a 10% em metanol. Daí procedeu-se de modo similar ao descrito em 3.3.1.2 e o volume final de extrato hexânico saponificado também foi de 5ml.

A Figura 4 ilustra o procedimento utilizado.

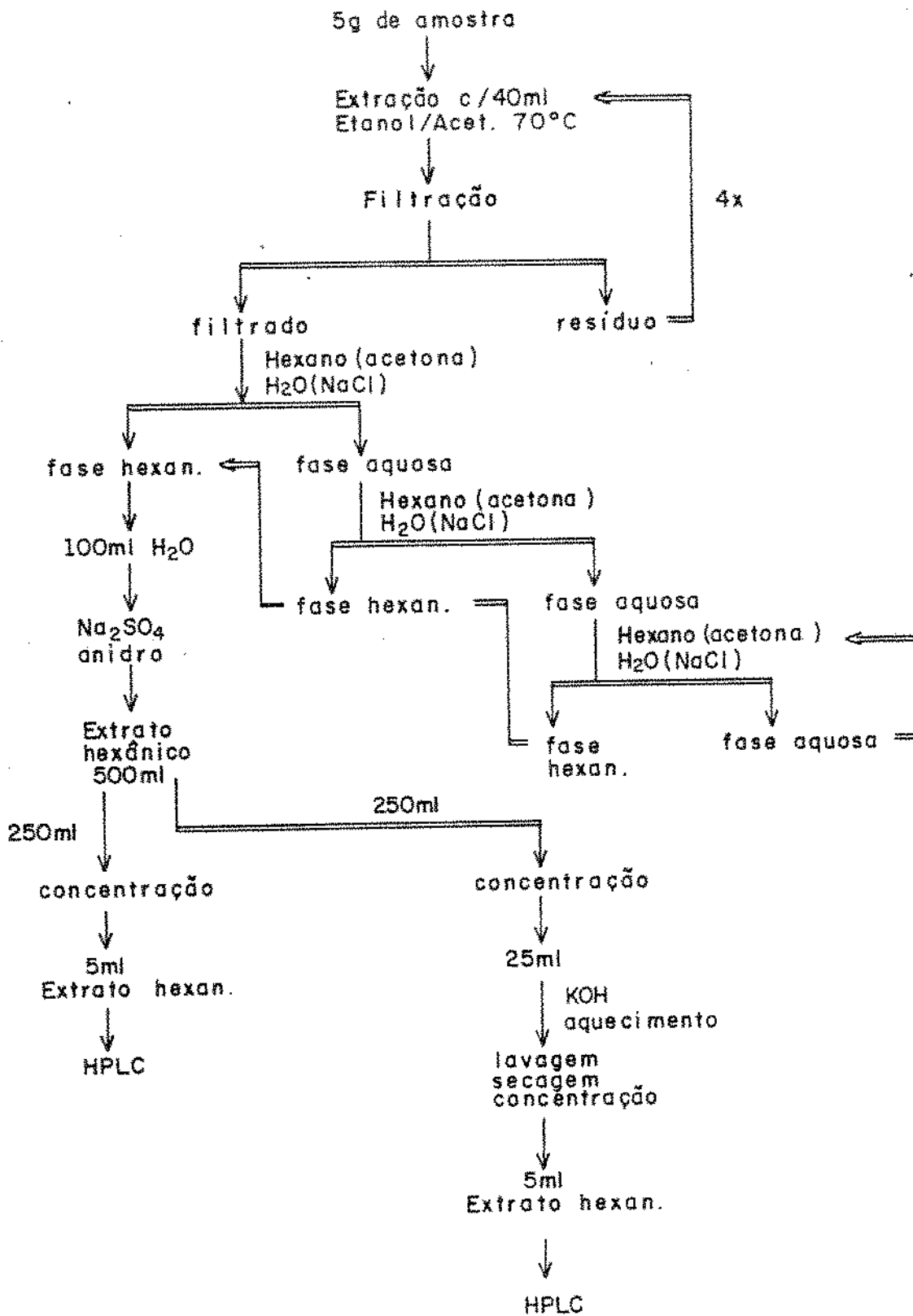


Figura 4 - Representação esquemática da extração de hortaliças folhosas

3.3.1.6 - Extração de sementes de urucum

Os extratos de urucum foram preparados de acordo com a técnica empregada pelo TDRI (Francis, 1970), onde 5g de sementes íntegras são transferidas para ampola de decantação de 250ml, extraíndo-se em seguida com 5 porções sucessivas (100, 80, 30, 20, 20ml) de clorofórmio, agitadas vigorosamente durante 2 minutos a cada porção e o extrato transferido, através de funil contendo lã de vidro, para balão volumétrico de 250ml e o volume completado com clorofórmio (solução X).

Na técnica usada pelo CTAA, 0,1g da amostra finamente pulverizada é transferida para balão volumétrico de 100ml com clorofórmio, agitada vigorosamente por inversão durante cerca de 3 minutos, de modo a garantir a solubilização total dos pigmentos, e o volume completado com clorofórmio (solução Y).

3.3.2 - Preparo de padrões

Para permitir a identificação dos componentes (de interesse), correspondentes aos picos dos cromatogramas das diferentes amostras de frutas, foram preparados padrões qualitativos.

Uma amostra de cada fruto em estudo foi extraída segundo a metodologia descrita e o extrato resultante aplicado ao topo de coluna de vidro de 25cm de comprimento e diâmetro interno 2,0cm, contendo óxido de magnésio/HyfloSupercel 1:2 (p/p) como fase estacionária. Aplicou-se vácuo brando na extremidade inferior e eluiu-se com hexano/acetona 100:0, 99:1, 98:2 etc., até 75:25. Diversas frações foram coleta-

das e sempre que se julgou conveniente a coluna foi secada e a(s) banda(s) de interesse cortada(s) e desessorvida(s) com acetona ou etanol. Cada fração ou banda foi evaporada em rotavapor e o resíduo retomado em volume mínimo de hexano.

Os compostos presentes foram identificados às custas de sua polaridade relativa (ordem de eluição da coluna), características do espectro de absorção e testes para detecção de epóxidos.

Padrões qualitativos para a identificação dos componentes de interesse de hortaliças folhosas foram obtidos de modo semelhante, partindo-se do extrato saponificado de uma nova amostra de caruru verde, enquanto que padrões dos pigmentos das sementes de urucum foram obtidos com uma coluna cromatográfica de C-18, tamanho de partícula de 50µm, utilizando-se pipeta de Pasteur e aplicando vácuo brando (Simpson et al., 1991). Extrato clorofórmico de urucum foi aplicado no topo da coluna previamente acondicionada com acetonitrila/água 1:2, eluindo-se com acetonitrila adicionada de quantidades decrescentes de água.

Os padrões, assim preparados, foram transferidos para frascos de soro de 2ml, fechados sob corrente de nitrogênio e colocados em refrigerador a -15°C.

Para quantificação dos componentes majoritários das amostras sob análise tornou-se imperioso preparar padrões quantitativos de luteína, alfa- e beta-caroteno, licopeno, beta-criptoxantina e bixina.

3.3.2.1 - Beta-caroteno

As frações A1 (goiaba) e A2 (caruru) foram reunidas, levadas à secura em rotavapor e retomadas com algumas gotas de etanol e 10ml de

hexano para tubo de centrífuga de 20ml. Borbulhou-se nitrogênio e, de tempo em tempo, adicionou-se 1 ou 2 gotas de metanol. Ao final de 6h o volume foi, aproximadamente, de 3ml e o beta-caroteno encontrava-se sob forma cristalizada. Os cristais foram cuidadosamente reunidos, secos, acondicionados em microflaconete de 0,3ml, lacrados sob corrente de nitrogênio e colocados em refrigerador a -15°C.

3.3.2.2 - Alfa-caroteno

A fração A1 do caruru recebeu tratamento semelhante ao descrito em 3.3.2.1, tendo-se no final cristais de alfa-caroteno em flaconete lacrado e conservado a -15°C.

Alternativamente, 25mg de alfa-caroteno (isento de beta-caroteno) e 5g de beta-caroteno (all-trans) foram adquiridos da Sigma Chemical Company e, quando necessário, utilizados após cristalização.

3.3.2.3 - Luteína

A banda A4 do caruru foi levada à secura em rotavapor, retomada em volume mínimo de metanol e aplicada ao topo da coluna de C-18 (pipeta de Pasteur) previamente acondicionada com metanol/água 98:2. Eluiu-se com pequenas porções do solvente na proporção citada, a seguir na proporção 99:1 e finalmente metanol 100%, de modo a afastar as impurezas mais polares e mantendo a banda principal na coluna. Deixou-se a coluna secar, a banda de interesse foi cortada, solubilizada com metanol/água 10% e concentrada. Transferiu-se para tubo de centrífuga com 2ml de metanol, fez-se passar corrente de nitrogênio, compensando o solvente evaporado com adições sucessivas de hexano, até a cristaliza-

ção. Os cristais foram reunidos, secados, transferidos para microflaconete, fechados sob nitrogênio e acondicionados a -150°C .

Alternativamente, 10mg de luteína natural, contendo 2% de zeaxantina, gentilmente cedidas pela Hoffmann-La Roche, Basel, Suíça, foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

3.3.2.4 - Licopeno

Durante concentração da banda V1 do tomate formou-se, repentinamente, uma massa cristalina com tendência de fixação nas paredes do balão. Imediatamente a evaporação foi interrompida e o balão resfriado (acarretando um aumento da massa cristalina). Os cristais foram separados por filtração, lavados com hexano gelado e transferidos para microflaconetes de 0,3ml. Os cristais aderidos à parede do balão foram também lavados com hexano gelado, solubilizados com volume mínimo de metanol, transferido para frasco de soro de 3,5ml e concentrado sob corrente de nitrogênio. O microflaconete e o frasco de soro foram fechados e acondicionados da maneira usual.

Alternativamente 100mg de trans licopeno, puro, cedidos pela firma mencionada em 3.3.2.3, foram utilizados sem nenhuma purificação adicional.

3.3.2.5 - Beta-criptoxantina

A banda L2 do mamão foi submetida à recromatografia e, após eluição de uma fração com 15% acetona/hexano, deixou-se a coluna secar e a banda principal foi dessorvida com acetona e levada à secura em rotavapor. Retomou-se em metanol e, após várias tentativas fracassadas de

cristalização, levou-se novamente à secura em rotavapor e solubilizou-se com volume mínimo de metanol. Transferiu-se para frasco de soro de 3,5ml, evaporou-se até secura sob corrente de nitrogênio, lacrou-se e acondicionou-se da forma habitual.

3.3.2.6 - Bixina

Como padrão quantitativo de bixina, utilizou-se a banda 3 da microcoluna de C-18, conforme mencionado em 3.3.2 (Simpson et al., 1991). Esta banda, dessorvida com 25% de água/acetonitrila, foi evaporada até a secura e o resíduo retomado com metanol para frasco de soro de 3,5ml. Levou-se novamente à secura, lacrou-se e acondicionou-se da forma habitual.

3.3.3 - Quantificação por CLAE

Utilizou-se um cromatógrafo líquido da firma Waters - Millipore constituído de um sistema de bombeamento de solvente (simples ou duplo) mod. 6000A, operando a uma vazão de 1ml/min (pressão igual a 1000 psi). O equipamento não possui válvula injetora, mas um injetor universal modelo U6K com 2ml de capacidade. A introdução da amostra (ou padrão) foi efetuada com microseringas Hamilton capacidade 1ul, Dynatech (Precision Sampling Corp) capacidade 10ul e/ou Hamilton 25ul. O detetor utilizado foi o de absorbância Modelo 441 com lâmpada de mercúrio e operando com o comprimento de onda de 436nm, às custas de um filtro apropriado. Operou-se o detetor na faixa média de sensibilidade, 0,05 ou 0,1 AUFS; o integrador-registrador acoplado, Data Module Model 730, operou com largura de pico 10, rejeição de ruído 50 e rejeição de

área 1000, com tempo total de corrida de 20 minutos (5 minutos para extrato de urucum). Operou-se sempre de modo isocrático, de forma que o microprocessador modelo 721 não precisou entrar em regime.

Empregou-se sempre solventes marca Lichrosolv (Merck), com grau de pureza adequado para a técnica em questão. Imediatamente antes do uso, os solventes (ou as misturas de solventes) foram filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, empregando membrana tipo FHUP, porosidade 0,5µm, adaptado ao vidro sinterizado e a seguir degasados (ainda sob vácuo) em ultrasonificador. Os extratos das amostras, por sua vez, foram filtrados em membranas FHLP-Millipore. Dispensou-se a passagem dos extratos por cartuchos SEP-PAK C-18, já que se considerou os extratos suficientemente purificados e, pela mesma razão, não foram utilizadas pré-colunas.

Para quantificação dos carotenóides principais das amostras foram utilizados os métodos de padronização externa e de adição de padrão. No primeiro, a área de um pico correspondente a um componente do extrato é calculada por comparação com as áreas de uma curva padrão do componente puro, áreas essas obtidas em idênticas condições cromatográficas. No segundo, a área de um pico correspondente a um componente do extrato é calculada pela comparação com a área de um pico correspondente àquele componente, adicionada de quantidade conhecida do mesmo componente puro. A quantidade (a) do componente (no volume injetado) é dado aplicando a fórmula (Johnson & Stevenson, 1978):

$$a = \frac{A_2 \cdot p}{(A_4 \cdot F) - A_2} \quad , \text{ onde } F = \frac{A_1}{A_3}$$

e:

A_1, A_3 - Área dos picos de referência

A_2 - área do pico sem adição de padrão

A_4 - área do pico com adição de padrão

p - quantidade de padrão adicionada

3.3.3.1 - Urucum

Para análise do extrato clorofórmico de semente de urucum utilizou-se uma coluna de aço inoxidável u-Bondapak-Fatty Acid Analysis, de 25cm de comprimento e diâmetro interno de 3.9mm, e eluiu-se com clorofórmio/metanol 99:1 durante 5 minutos.

Com esta combinação fase estacionária/fase móvel, o cromatograma mostrou 2 picos, o primeiro correspondendo a 1 ou 2 componentes mais polares que norbixina e com absorção forte em 422 e 438nm. A presença deste pico mostrou ser muito interessante já que foi usado como pico de referência, permitindo assim, a quantificação também pelo método da adição de padrão. A norbixina não conseguiu ser separada, sendo englobada pela bixina, de concentração muito mais elevada. As duas

substâncias apareceram como um único pico, imediatamente após o pico de referência, e como tal foram quantificadas.

Do extrato clorofórmico de cada uma das 12 amostras foram injetados 5µl, em duplicata, e as áreas obtidas comparadas com as de uma curva padrão de bixina. A seguir, injetou-se nova porção de 5µl adicionada de 1µl de solução clorofórmica de bixina de concentração conhecida, também em duplicata.

3.3.3.2 - Hortaliças e frutas

Os extratos das amostras de frutas (e produtos processados) e hortaliças (com e sem saponificação) foram injetados, em duplicata, numa coluna de aço inoxidável NovaPak C-18, de 15cm de comprimento e diâmetro interno de 3,9mm, e eluídos com acetonitrila/clorofórmio 98:2 durante 20 minutos.

Os componentes de interesse foram quantificados por comparação das áreas obtidas com as das curvas padrão dos mesmos componentes.

Os extratos foram igualmente re-injetados, após a adição prévia de volumes conhecidos de 1, 2 ou até 3 padrões quantitativos dos componentes de interesse.

Assim, no caso das amostras de manga (e produtos processados), o único componente de interesse, o beta-caroteno, pode ser quantificado graças a um pico adicional de luteoxantina (XXVI) ou violaxantina (VIII), tomados como pico referência. Devido à ausência (ou tamanho demasiadamente reduzido) desse pico nos extratos de "mango-chutney" e das 2 amostras de suco de manga, o beta-caroteno não pôde ser aí quantificado através do método da adição de padrão.

No caso de goiaba (e produtos processados), onde ocorrem 2 compostos majoritários, beta-caroteno e licopeno, cada qual serviu de pico de referência para o outro no método da adição de padrão, dada a ausência de outro componente que pudesse fornecer o pico adicional a ser tomado como referência, o que implicou em duas injeções adicionais.

No caso das amostras de tomate, a situação foi idêntica à da goiaba, com os mesmos componentes de interesse e nenhum outro componente capaz de fornecer um pico de referência. Foram, portanto, também necessárias duas injeções adicionais por amostra.

Nas amostras de mamão (e produtos processados), onde os extratos mostraram 3 componentes majoritários, licopeno, beta-caroteno e beta-criptoxantina, também houve necessidade de duas injeções adicionais por amostra, devido à ausência de pico de referência comum.

Os extratos saponificados das amostras de hortaliças folhosas foram quantificados de modo análogo aos extratos de mamão, já que também havia 3 componentes de interesse, alfa- e beta-caroteno e luteína, e nenhum outro componente que pudesse fornecer um pico de referência comum. Foram necessárias, igualmente, 4 injeções por amostra.

Nos extratos não saponificados das amostras de hortaliças folhosas, a quantificação dos 3 componentes anteriormente citados representa um exemplo do caso mais favorável para aplicação do método da adição, já que existem componentes adicionais podendo fornecer picos de referência e cuja quantificação não se constitui em objetivo. Injeções, em duplicata, do extrato não saponificado adicionado simultaneamente de alfa-caroteno, beta-caroteno e luteína são suficientes para quantificação desses 3 componentes, tomando como referência o pico correspondente a uma das clorofilas.

3.3.4 - Quantificação de bixina por espectrofotometria

Para determinação de bixina em extratos de urucum através do método espectrofotométrico utilizou-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8451A com detetor de arranjo de diodos; empregou-se clorofórmio Uvasol-Merck e cubetas de quartzo de 1cm de espessura.

No caso de extratos de sementes inteiras, tomou-se uma alíquota (1, 2 ou 3ml) da solução X (conforme 3.3.1.6) para balão volumétrico de 100ml e completou-se o volume com clorofórmio. Mediu-se a absorbância a 470nm, de modo a obter-se leituras de absorbâncias entre 0,155 e 0,700. Calculou-se o teor de bixina na amostra utilizando-se a lei de Beer e supondo um valor de 2826 para o coeficiente de extinção específico da bixina em clorofórmio, a 470nm.

Os extratos de sementes moídas tiveram tratamento semelhante; tomou-se uma alíquota (1, 2 ou 3ml) da solução Y (conforme 3.3.1.6), transferiu-se para balão volumétrico de 25ml, completou-se o volume com clorofórmio, mediu-se a absorbância a 470nm e calculou-se o teor de bixina na amostra original empregando a lei de Beer.

3.4 - Avaliação da Precisão e Exatidão

Os carotenóides majoritários de uma série de amostras de 4 diferentes tipos de frutos e seus produtos processados, de 5 hortaliças folhosas diferentes e de 12 amostras de sementes de urucum foram quantificados por dois métodos distintos.

Para comparar os resultados obtidos, calculou-se a estimativa do desvio padrão da determinação de cada um dos componentes quantificados usando os 2 métodos. Aplicou-se a fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x'_i - x''_i)^2}{2M}}$$

com $n = M$ graus de liberdade, que se aplica sempre que um conjunto de amostras diferentes é analisado em duplicata (Doerffel, 1967); x' e x'' são os resultados correspondentes à análise em duplicata de cada amostra, M é o número de amostras submetidas à análise e n o número de graus de liberdade.

Determinou-se, igualmente, seu correspondente relativo, o coeficiente de variação:

$$CV = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Para avaliar a precisão dos resultados obtidos, empregou-se o teste F, que compara duas variâncias (Dowdy, 1983) usando a fórmula:

$$F_{n_1, n_2} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

A razão deve ser obrigatoriamente maior que 1; n_1 e n_2 são os graus de liberdade correspondentes a S_1 e S_2 , respectivamente.

Para verificar a equivalência dos resultados obtidos pelos 2 diferentes métodos foi aplicado o teste t, utilizando a fórmula:

$$t = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) \cdot \sqrt{\frac{n(n-1)}{\sum (D_i - \bar{D})^2}}$$

com $n - 1$ graus de liberdade, aplicável quando um conjunto de amostras diferentes é analisado por 2 métodos diferentes, A e B, onde \bar{x}_A e \bar{x}_B são as médias dos resultados obtidos nos métodos A e B, respectivamente; D_i é a diferença entre as médias obtidas e \bar{D} a média desses valores (Eckschlager, 1972).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Composição da Matéria-Prima

As amostras de frutas, conforme mencionado anteriormente, foram analisadas quanto ao teor de umidade, acidez e sólido solúveis, já que a presença dos diferentes carotenóides (e seus teores relativos) está relacionada ao grau de amadurecimento do fruto.

Essas determinações foram realizadas também, nos produtos processados, apesar da incapacidade intrínseca de relacionar estes valores com a natureza e o teor de carotenóides, já que a adição de ácido cítrico e sacarose é prática usual.

As Tabelas 3 a 6 mostram os resultados da composição para goiaba, manga, tomate e mamão (e seus produtos processados), respectivamente.

Nas amostras de hortaliças folhosas determinou-se apenas o teor de umidade, já que as folhas mostram composição predominantemente monotônica e repetitiva dos componentes majoritários (e dos carotenóides por extensão). A Tabela 7 relaciona os teores de umidade destas amostras, bem como de 12 amostras de semente de urucum.

Tabela 3 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de goiaba

AMOSTRA	ANALISES	UNIDADE g/100g	ACIDEZ TOTAL		°Brix
			ml NaOH 1N/100g	g ác. cítrico/100g anidro	
fruto maduro	1	90,0	7,62	0,49	5,70
	2	90,8	7,25	0,46	4,80
	3	91,8	6,36	0,40	5,25
	4	88,4	6,97	0,45	5,20
	5	87,8	7,95	0,51	4,00
	6	86,5	6,80	0,44	5,90
	7	86,8	6,14	0,39	5,80
doce em calda	A	72,2	6,04	0,39	22,50
	B	60,3	7,44	0,48	25,02
geleia	A	31,8	5,83	0,37	63,44
	B	29,5	5,04	0,32	60,04
	C	27,4	3,13	0,20	63,48
	D	26,2	4,19	0,27	66,22
doce em massa	A	25,4	9,86	0,63	69,50
	B	26,5	9,65	0,62	69,22
	C	25,4	12,15	0,78	69,02
suco		94,5	6,83	0,44	5,40

Tabela 4 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de manga

ACIDEZ TOTAL					
ANÁLISES	UMIDADE	ml NaOH 1N/100g	g ác. cítrico/100g	°Brix	
AMOSTRA	g/100g		anidro		
polpa madura 1	85,8	23,76	1,52	13,58	
2	87,2	17,37	1,11	11,42	
3	88,7	7,73	0,49	8,12	
4	87,8	9,88	0,63	12,30	
5	87,4	8,81	0,56	14,60	
6	90,0	5,84	0,37	10,76	
7	87,3	6,87	0,39	11,82	
8	87,6	5,96	0,38	13,88	
9	83,7	5,99	0,38	14,18	
10	88,4	4,19	0,27	10,71	
11	86,7	4,98	0,32	16,22	
12	85,3	5,87	0,32	14,89	
13	87,5	4,86	0,31	11,86	
"mango chutney"	46,8	9,43	0,60	48,18	
doce em calda	65,4	2,89	0,18	26,80	
suco	n	88,6	9,40	0,60	9,86
	Σ	88,3	9,83	0,58	9,82

Tabela 5 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de tomate.

ACIDEZ TOTAL				
ANALISES AMOSTRA	UMIDADE g/100g	ml NaOH 1N/100g	g ác. cítrico/100g anidro	°Brix
fruto maduro I	94,7	4,42	0,28	3,52
2	95,6	4,86	0,31	2,73
3	96,3	4,87	0,26	2,35
4	95,3	4,56	0,29	2,98
5	95,1	4,39	0,28	2,44
6	95,7	4,86	0,31	2,46
extrato				
A	74,1	16,83	1,83	15,58
B	71,2	16,17	1,83	15,52
C	83,5	9,11	0,58	6,22
purê				
A	88,9	8,61	0,55	6,82
B	88,4	10,56	0,68	6,82
catchup				
A	65,3	13,82	0,88	25,18
B	66,6	17,28	1,18	24,16
saco				
A	92,4	4,48	0,28	5,04
B	96,5	3,84	0,24	6,58

Tabela 6 - Composição das amostras de frutos e produtos processados de mamão

ACIDEZ TOTAL					
ANÁLISES AMOSTRA		UMIDADE g/100g	ml NaOH 1N/100g	g ac. cítrico/100g anidro	°Brix
polpa madura	1	88,4	3,24	0,21	7,16
	2	88,7	3,53	0,23	6,22
	3	88,3	3,58	0,23	7,90
	4	88,4	2,68	0,17	6,93
	5	90,6	2,84	0,18	6,12
	6	93,9	2,22	0,14	4,60
	7	93,0	2,25	0,14	4,48
idem, crist.	A	16,3	2,80	0,18	68,80
	B	16,7	3,07	0,20	68,30
	C	16,5	2,61	0,17	66,80
polpa verde	8	94,4	3,62	0,23	4,11
	9	91,0	2,07	0,13	4,38
	10	94,9	2,83	0,18	3,70
	11	94,8	3,48	0,22	4,40
	12	90,4	2,00	0,13	3,78
	13	89,7	2,82	0,13	4,17
	14	93,9	3,56	0,23	4,12
idem, doce		44,9	2,48	0,16	48,00

S = 0,51

S = 0,12

S = 0,16

Δ = 0,21

Δ = 0,06

Δ = 0,07

Tabela 7 - Teores de unidade das amostras de sementes de urucum e de hortaliças folhosas

ANALISE AMOSTRA	UNIDADE g/100g
urucum sementes 1	15,51
2	14,36
3	14,73
4	16,15
5	16,86
6	15,10
7	15,78
8	16,81
9	15,48
10	15,34
11	16,88
12	17,31
caruru (Alagoas)	91,78
ora-pro-nobis	86,30
caruru verde	84,39
taioha	89,86
bedroega	90,11
	$S = 0,00$
	$\Delta = 0,03$

4.2 - Padronização do método

4.2.1 - Pureza dos padrões

Os padrões qualitativos separados conforme descrito em 3.3.2 foram analisados por CLAE nas mesmas condições das amostras. Na maior parte das vezes, os cromatogramas apresentaram, ao lado de vários picos menores, um ou dois picos de área maior. A Tabela 8 relaciona as principais frações e bandas.

Para a quantificação dos carotenóides presentes nas amostras utilizaram-se os padrões cujo preparo foi descrito em 3.3.2.1 a 3.3.2.6. No caso de material cristalino, uma pequena porção foi observada sob luz polarizada em aparelho para determinação do ponto de fusão segundo Koffler, podendo-se notar com facilidade uma massa translúcida no campo microscópico escurecido.

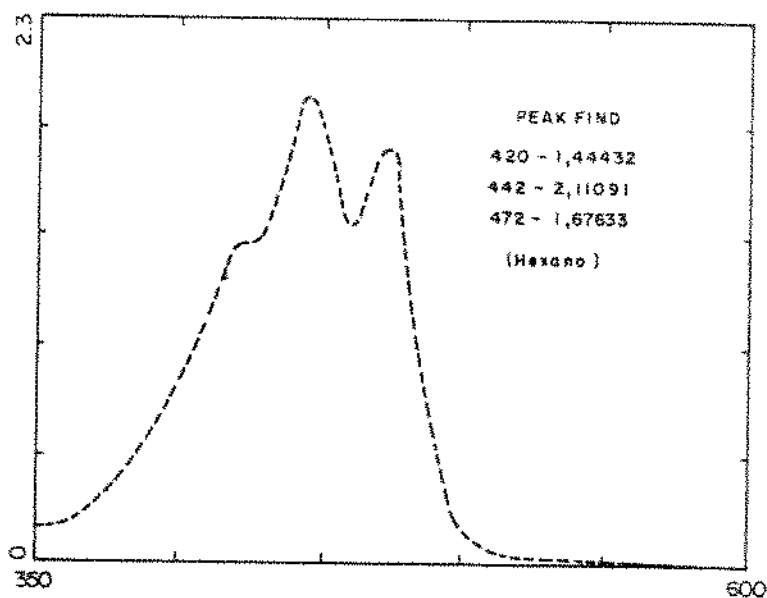
Todos os padrões, mesmo aqueles onde não se conseguiu cristais, mostraram espectros de absorção com boa resolução das bandas e, as absorções máximas dos picos corresponderam, com pouca variação, aos valores citados na literatura (Davies, 1976).

Quando submetidos à análise cromatográfica nas condições citadas em 3.3.3, todos os padrões apresentaram um único pico.

As Figuras 5 a 12 mostram os espectros de absorção dos padrões e seus respectivos cromatogramas.

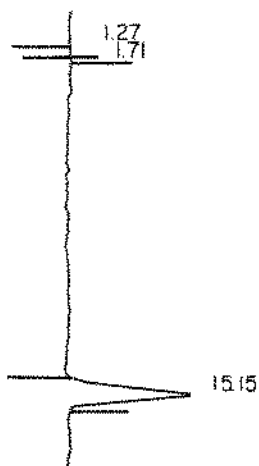
Tabela 8 - Padrões qualitativos para CLAE

	CODIGO	Eluente % Acet/Hex	Absorção máxima (hexano) nm	composição provável
MANGA	FL1	1	___, 448, 476	beta-caroteno
	FA2	18	___, 442, 479	5,6 - epóxi - beta-caroteno
	FA4	25	414, 438, 468	5,6,5',6' - diepóxi - beta-caroteno
	BA4		416, 448, 478	violaxantina
GOIABA	FA1	5	___, 458, 476	beta-caroteno
	FA1-2		378, 408, 425	zeta-caroteno
	FA1-3		406, 428, 454	beta-zeacaroteno
	FA2	18	___, 454, 476	beta-criptoxantina
	BW1		(368) 448, 468, 496	cis-licopeno
TOMATE	BA1	5	332, 346, 368	fitoflaeno +
			___, 458, 476	beta-caroteno
	BA2		378, 408, 424	zeta-caroteno
	BL1		438, 468, 486	gamma-caroteno
	BL1-1	25	448, 466, 508	neurosporeno
		(acet) 448, 474, 506	all-trans-licopeno	
MAMBO	FA2	2	___, 448, 476	beta-caroteno
	BL2		___, 448, 476	beta-criptoxantina
	BL3		428, 442, 478	5,6 - epóxi-beta-criptoxantina
	BA6-8		416, 442, 468	5,6,5'6' - diepóxi - beta-criptoxantina
CABURU	FA1	2	428, 442, 472	alfa-caroteno
	FA2	5	___, 448, 474	beta-caroteno
	FA3	18	___, 442, 466	neoxantina
	BA4		(EtOH), 446, 474	luteína
URUCUM		CH ₂ CN/H ₂ O	absorção máxima (EtOH)	composição
	F1	50 : 50	___, 418, 428	2 compostos
	F2	50 : 50	___, 468, 498	norlinoxina
	F3	60 : 40	___, 478, 508	lixina



LITERATURA*
 420, 442, 472

INJECT

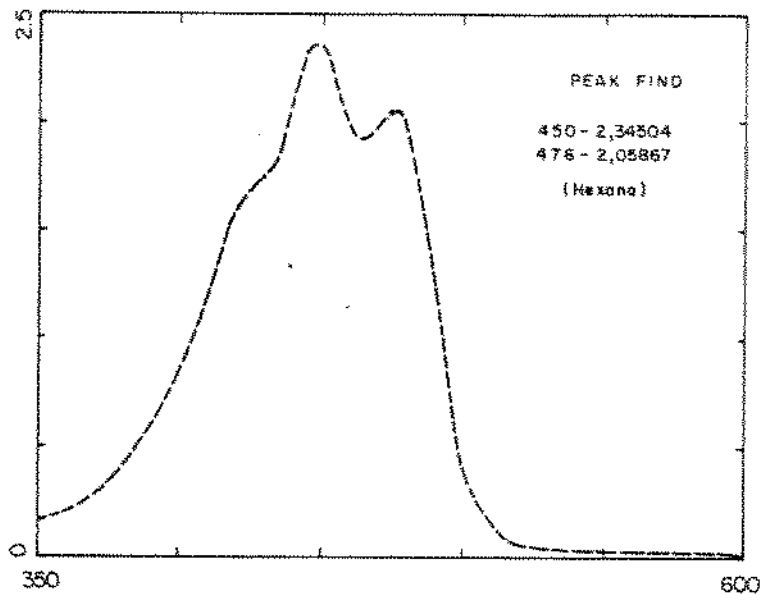


PRESSURE 500.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/050
 RUN #8 CALC #0
 COLUMN SOLVENT OPR ID 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

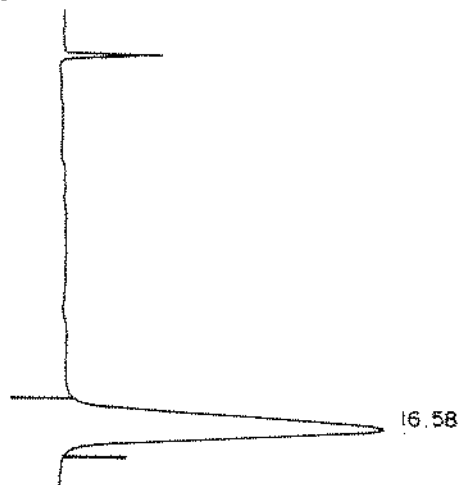
PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	41.48100	1.71		41481 L	0.000000E0
	1316.63000	15.15		1316632 L	0.000000E0
TOTAL	1358.11000				

Figura 5 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE ALFA-CAROTENO
 *Referência: Davies, 1976



LITERATURA*
(425), 450, 477

INJECT

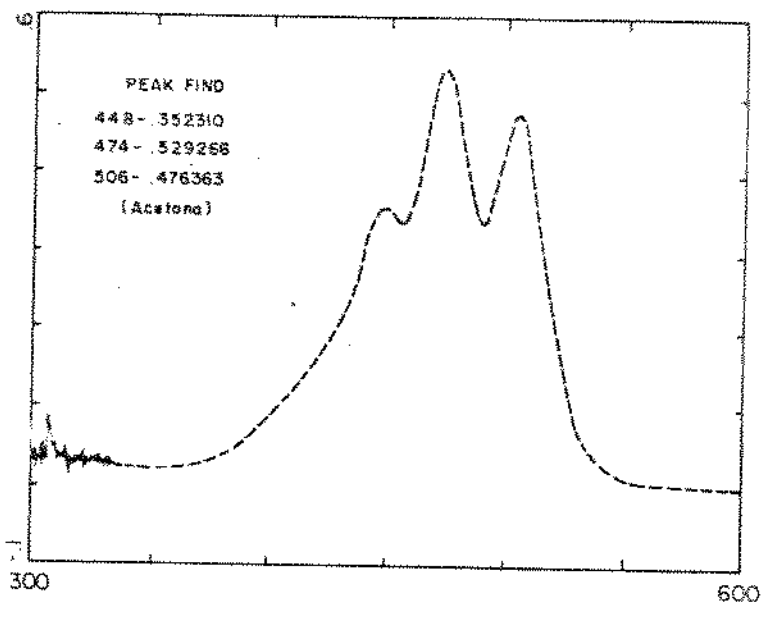


PRESSURE 500.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/200
 COLUMN RUN #13 SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

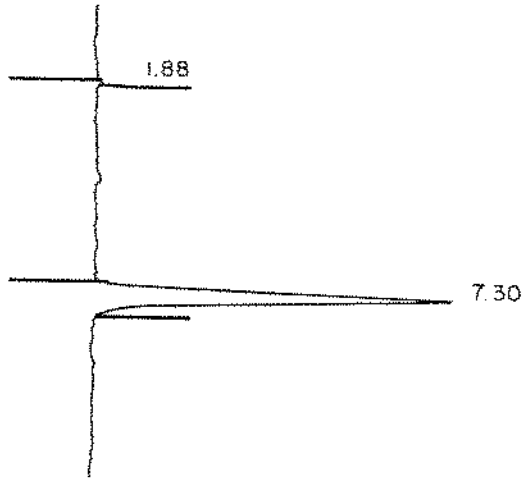
EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
TOTAL	21967.60000	16.58		21967775 L	0.000000E0

* Figura 6 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE BETA-CAROTENO
 *Referência: Davies, 1976.



INJECT

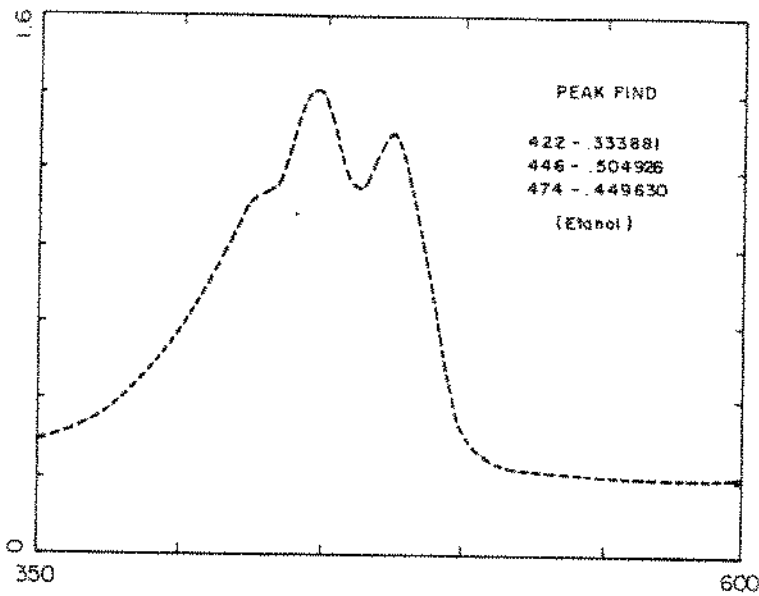


PRESSURE 1000.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/200
 COLUMN RUN #13 CALC #0
 SOLVENT OPR ID: 7

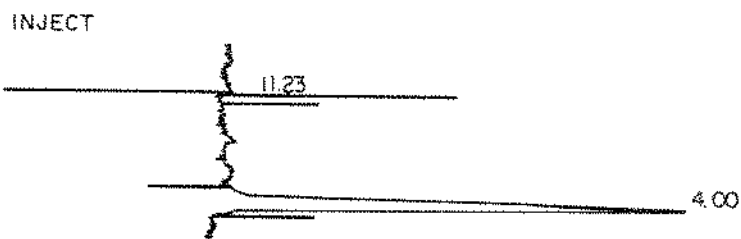
EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
TOTAL	5215.85000	7.30		5215883 L	0.000000E0

Figura 7 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE LICOPENO
 *Referência: Davies, 1976.

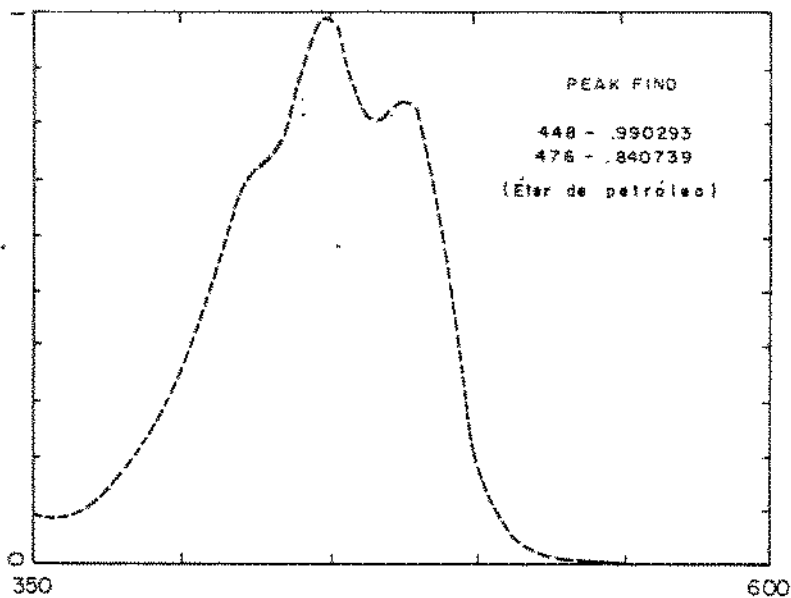


LITERATURA*
421,445,474



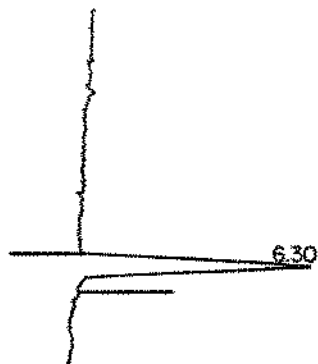
PRESSURE	500.0	CHART	0.50 CM/MIN	FLOW	1.00 ML/MIN
COLUMN		DETECTOR	441/020	CALC #0	
		RUN # 5		OPR ID.	7
		SOLVENT			
EXTERNAL STANDARD QUANTITATION					
PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	535 55200	4.00		535552	0 000000E0
TOTAL	53555200				

Figura 8 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE LUTEÍNA
* Referência: Davies , 1976



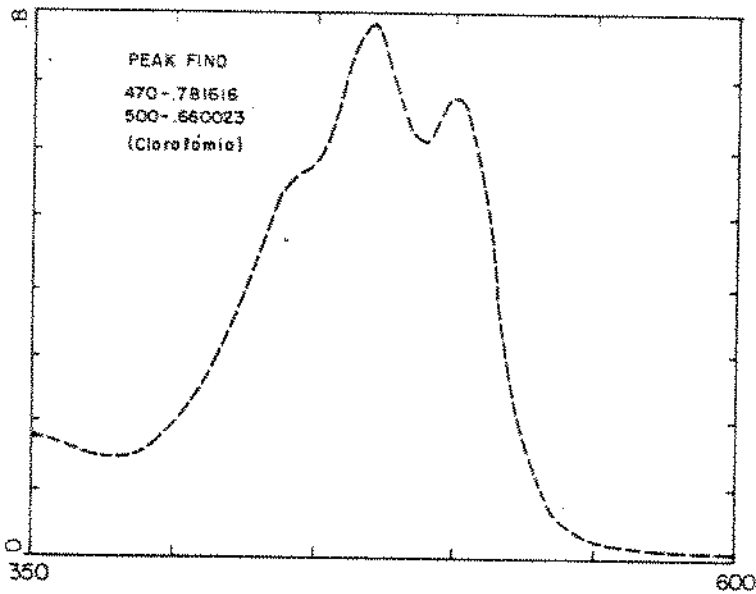
LITERATURA*
(425), 449, 475

INJECT

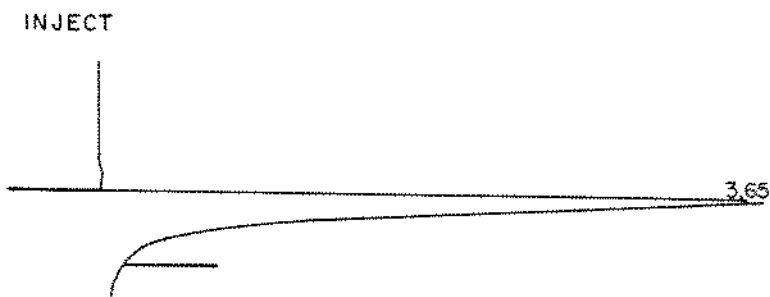


PRESSURE	1000.0	CHART	0.50 CM/MIN	FLOW	1.00 ML/MIN
COLUMN		DETECTOR	441/050	CALC #	0
		RUN #	7	OPR ID:	7
		SOLVENT			
EXTERNAL STANDARD QUANTITATION					
PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	872.70000	6.30		872700 L	0.000000E0
TOTAL	872.70000				

Figura 9 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE BETA-CRIPTOXANTINA.
*Referência: Davies, 1976



LITERATURA :
,470,501

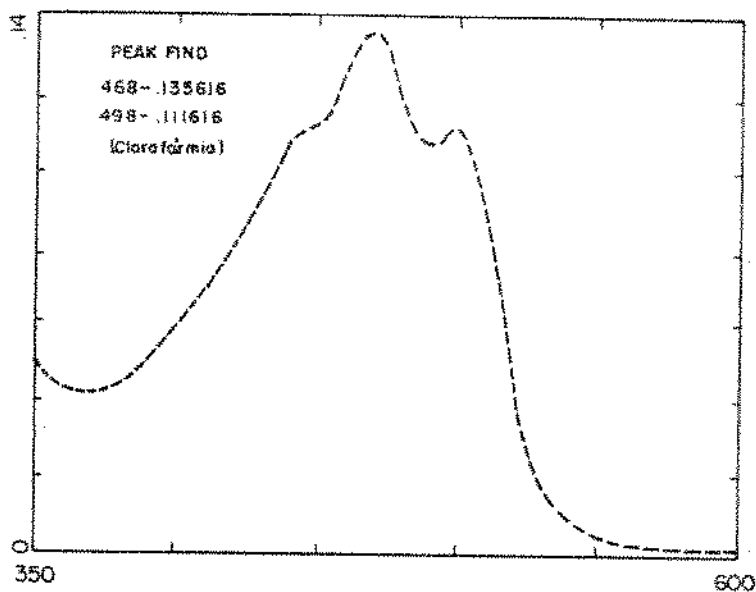


PRESSURE 300.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
DETECTOR 441/100
RUN # 30 CALC #0
COLUMN SOLVENT OPR ID 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
TOTAL	8472.19000	3.65		8472238 L	0.000000E0

Figura 10 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE BIXINA
Referência : Reith & Gielen, 1971



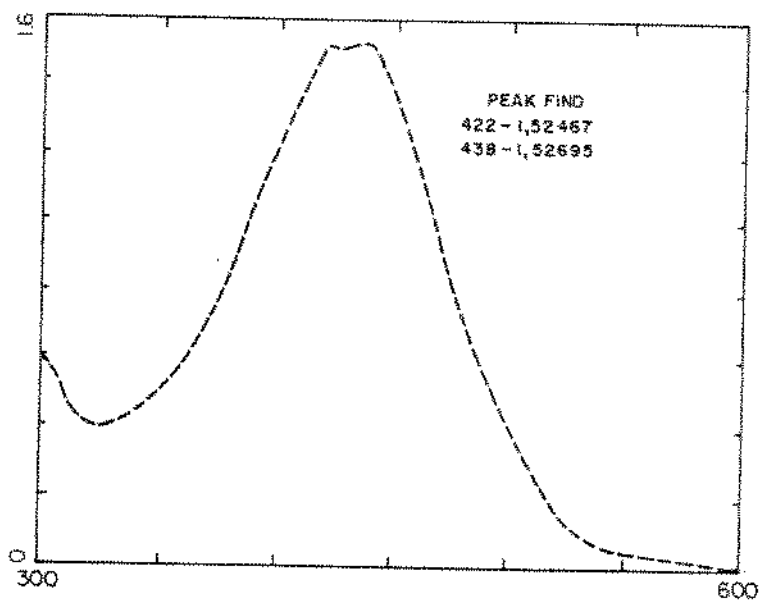
LITERATURA:
 ,468,499

PRESSURE 300.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/200
 RUN #13 CALC #0
 SOLVENT OPR ID 7

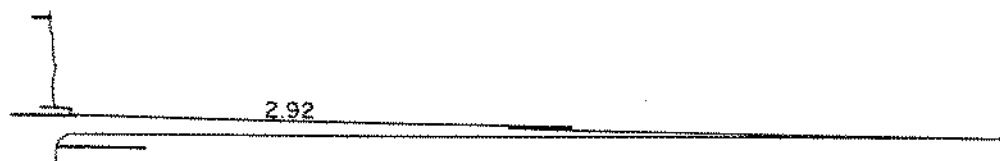
EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
TOTAL	1307.43000	3.45		1307434 HL	0.000000E0

Figura II - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE NORBIXINA
 Referência: Reith & Gielen, 1971.



INJECT



PRESSURE 300.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
DETECTOR 441/050
RUN #11 CALC # 0
COLUMN SOLVENT OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	2297.79000	2.92		2297799 L	0.000000E0
TOTAL	2297.79000				

Figura 12 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO E CROMATOGRAMA DE F1 (URUCUM)

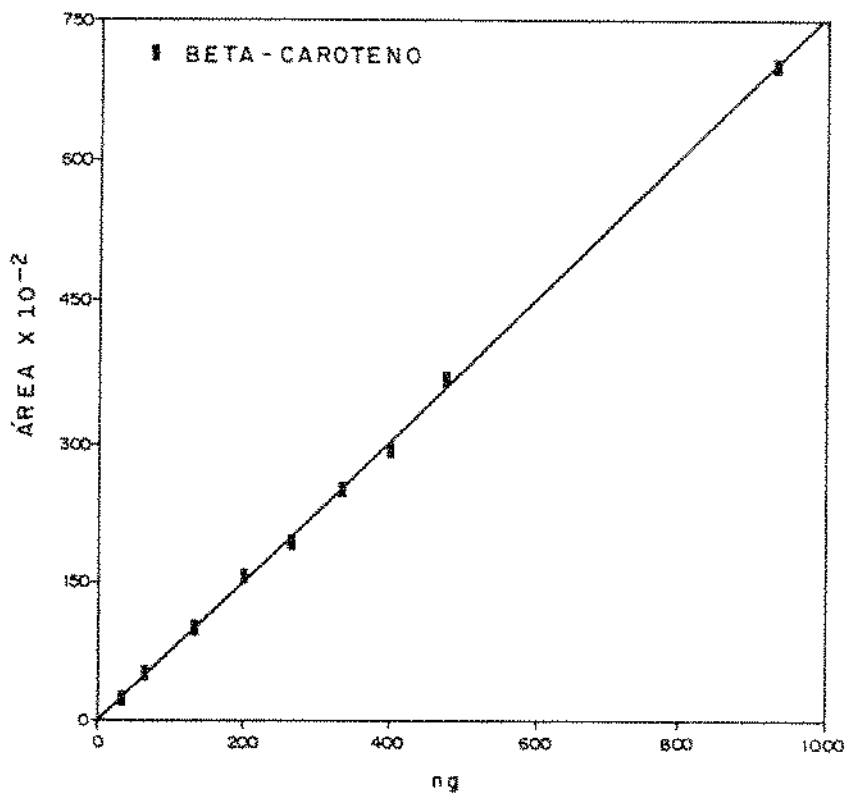
4.2.2 - Curvas padrão

Para obtenção das curvas padrão, injetou-se volumes iguais de solução padrão, com pelo menos 5 concentrações diferentes e conhecidas, sempre em duplicata, de modo a ter-se gráficos de áreas versus massas (ou concentrações) em nanogramas: de 50 a 1000ng (beta-caroteno, licopeno, luteína e bixina) ou de 50 a 500ng (alfa-caroteno e beta-criptoxantina).

Na medida em que o tipo do injetor assim o permitiu, o trabalho pode ser facilitado e as curvas padrão foram construídas injetando-se, em duplicata, volumes diferentes da solução original de concentração conhecida, sem necessidade de preparo de diluições.

As Figuras 13 a 18 mostram as curvas padrão empregadas na quantificação de carotenóides pelo método da padronização externa. As curvas foram traçadas em microcomputador Hewlett Packard 85 C, que também calculou o valor de R^2 da regressão linear.

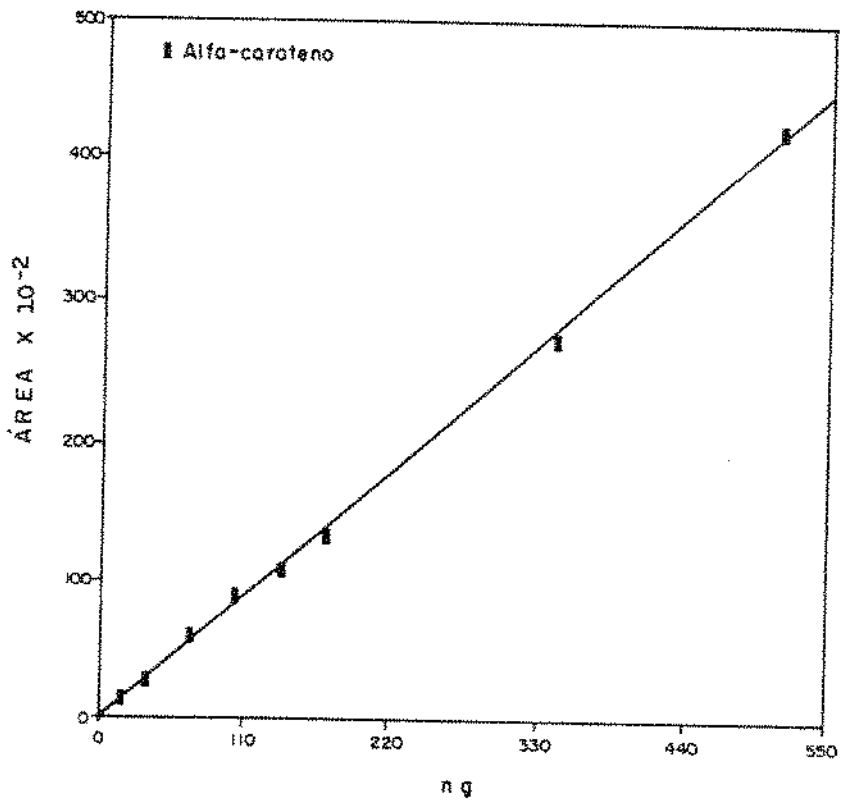
	X	Y
1	- 33.27261	24.9844
2	- 66.54512	49.8814
3	- 133.0902	99.8656
4	- 199.6753	157.470
5	- 266.1804	194.300
6	- 332.7255	252.860
7	- 399.2706	293.800
8	- 475.8157	366.140
9	- 931.6314	702.215



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -
 $(7.883 \text{ E} - 02) + (7.543 \text{ E} - 01) * x$
 $R^2 = 9.99 \text{ E} - 01$

Figura 13 - CURVA PADRÃO DE BETA-CAROTENO

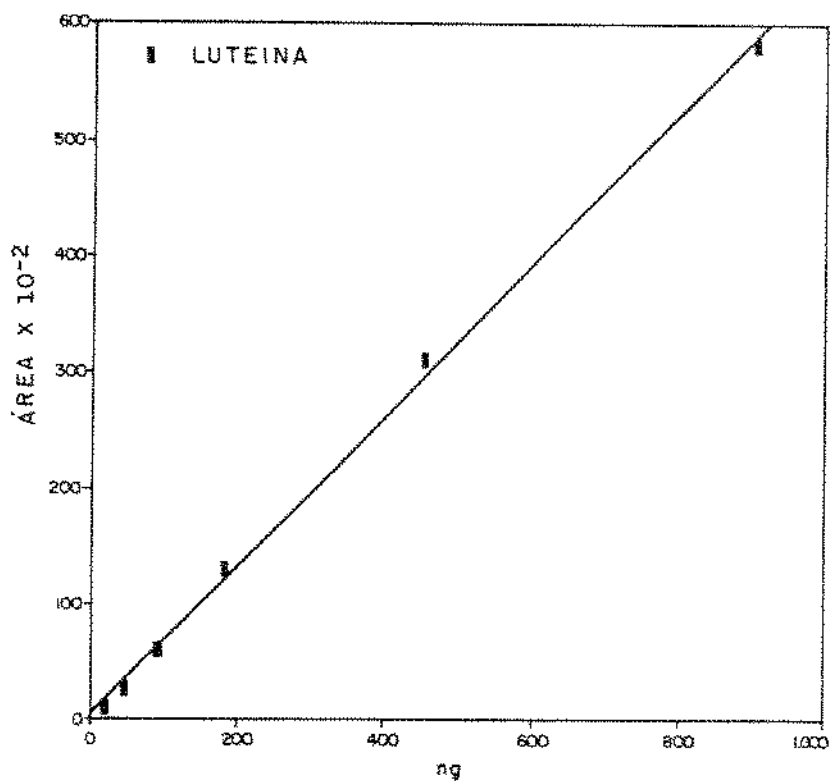
	X	Y
1	17.0571	15.252
2	34.1142	27.612
3	68.2284	59.785
4	102.343	88.971
5	136.457	109.85
6	170.571	133.51
7	341.142	273.11
8	511.713	425.22



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -
 $(1.180E-01) + (8.197E-01) * X$
 $R^2 = 9.99E-01$

Figura 14 - CURVA PADRÃO DE ALFA-CAROTENO

	X	Y
1	18.0944	11.305
2	45.2361	26.779
3	90.4722	61.504
4	180.844	130.91
5	452.361	312.17
6	904.722	582.63



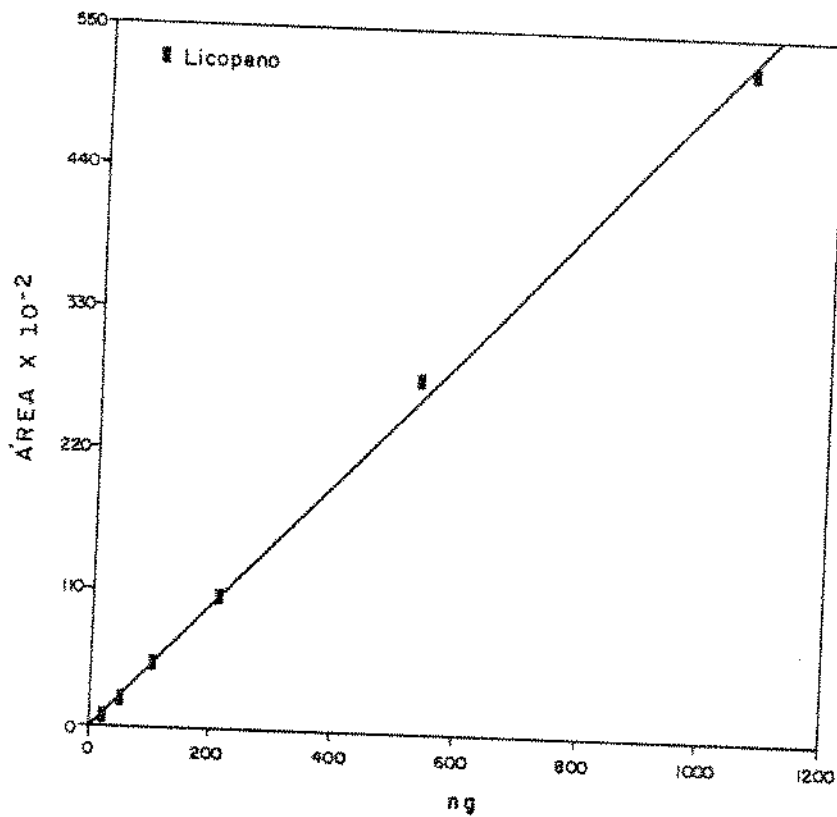
THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1

$$(4.960E+00)+(6.476E-01)*X$$

$$R^2 = 9.98E-01$$

Figura 15 - CURVA PADRÃO DE LUTEÍNA

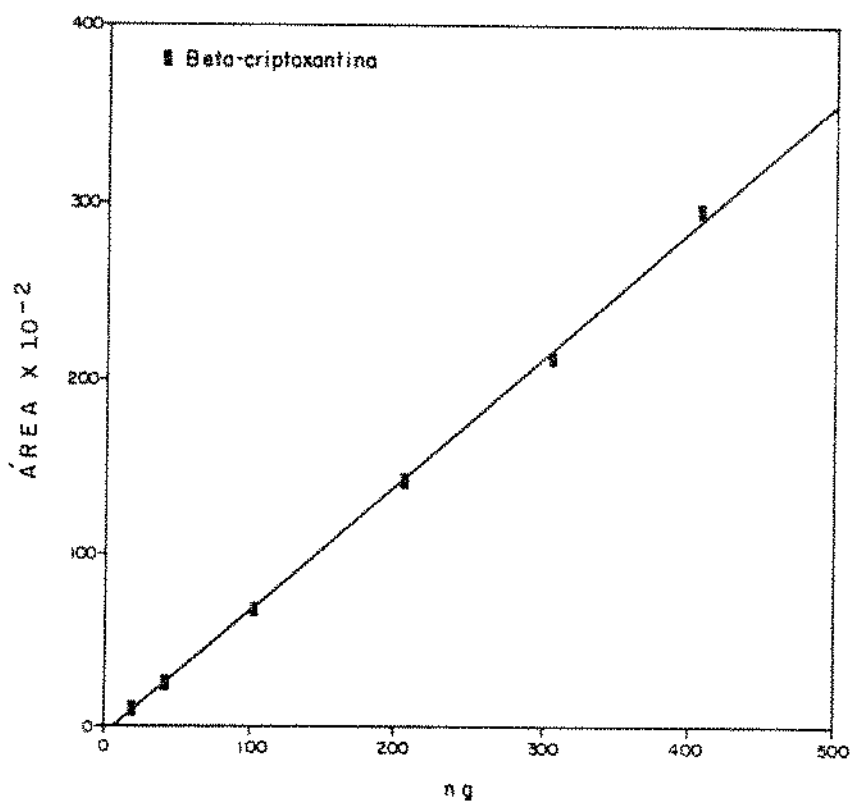
	X	Y
1	21.2324	7.9555
2	53.1081	22.796
3	106.162	51.501
4	212.324	106.97
5	520.211	277.25
6	1061.68	522.02



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -
 $(1.255 \text{ E} - 01) + (4.977 - 01) * X$
 $R^2 = 9.99 \text{ E} - 01$

Figura 16 - CURVA PADRÃO DE LICOPENO

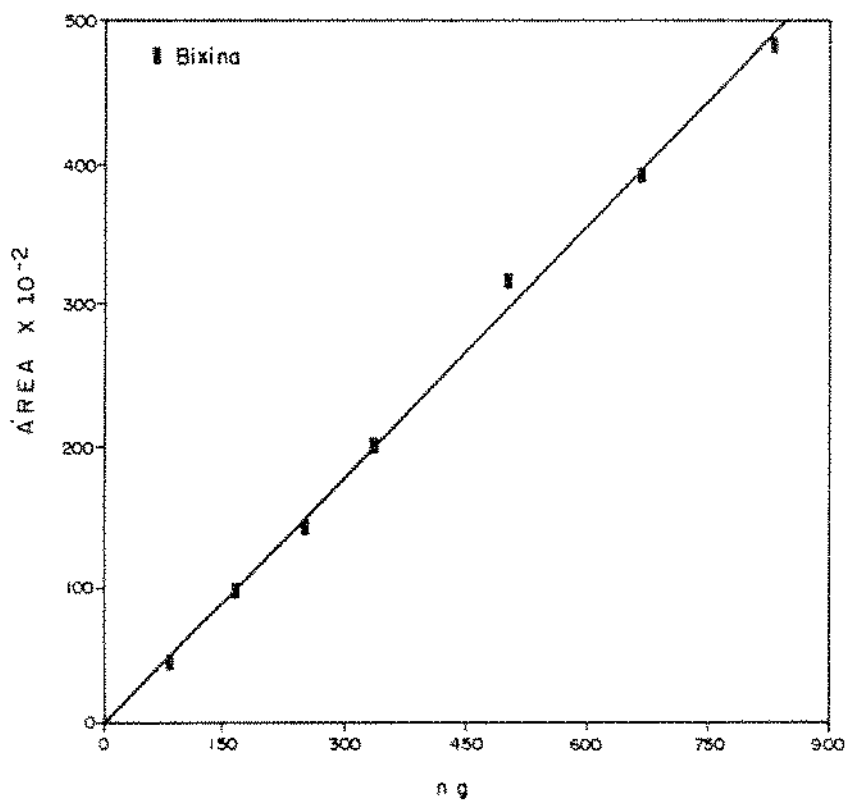
	X	Y
1 -	20.4729	12.3214
2 -	40.9458	24.8845
3 -	102.354	68.7533
4 -	204.729	143.200
5 -	307.094	211.440
6 -	409.458	297.430



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -
 $(-4.917 E +00) + (7.258 E -01) * X$
 $R^2 = 9.99 E -01$

Figura 17 - CURVA PADRÃO DE BETA-CRIPTOXANTINA

	X	Y
1	83.14240	44.443
2	166.2848	97.392
3	249.4272	142.72
4	333.5797	202.06
5	498.8544	316.84
6	665.1792	392.90
7	831.1240	482.04



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1
 $(8.922E-01) + (5.913E-01) * X$
 $R^2 = 9.96E-01$

Figura 18 - CURVA PADRÃO DE BIXINA

4.2.3 - Avaliação de solventes na extração de carotenóides de frutas

Para avaliar a eficiência dos solventes, utilizaram-se 10 diferentes sistemas na extração dos carotenóides de uma amostra de goiaba (Tabela 9) e uma amostra de mamão (Tabela 10).

Observa-se que, tanto em mamão quanto em goiaba, os extratos originais (I a V) mostram teores mais baixos que os correspondentes extratos hexânicos, provavelmente pelo efeito dos solventes na absorção. Os sistemas de solventes contendo etanol levaram à obtenção de extratos com teores mais elevados de carotenóides, tanto em goiaba quanto em mamão, sendo o metanol o menos eficaz. Por isso, as amostras de frutos e seus produtos aqui considerados, foram sempre extraídos com etanol/hexano 1:1.

4.2.4 - Estabelecimento das condições cromatográficas

Ensaios foram realizados para verificar a eficiência da separação dos carotenóides de goiaba, utilizando o módulo de compressão radial Waters e cartuchos RadialPak com 4 fases distintas: μ -Bondapak C-18, CN, NH_2 e μ -Porasil.

Cada uma dessas fases foi injetada com extrato hexânico de goiaba, empregando pelo menos 4 fases móveis distintas e determinando-se, nos cromatogramas obtidos, a área total, o número de picos, o tempo de corrida e a diferença entre o tempo de retenção do licopeno em relação ao beta-caroteno. As Tabelas 11 a 14 mostram os resultados obtidos com cada fase estacionária.

Tabela 9 - Extração dos carotenóides de goiaba com diferentes solventes

SOLVENTE	CÓDIGO	CAROTENÓIDES TOTAIS (µg.g ⁻¹)	
		EXTR.ORIGINAL	EXTR.HEXÂNICO
Metanol	I	25,59	26,87
Etanol	II	61,72	62,74
Acetona	III	48,00	51,47
MeOH/Acet	IV	54,83	57,41
EtOH/Acet	V	57,17	60,60
MeOH/Hex	VI		28,70
EtOH/Hex	VII		63,25
Acet/Hex	VIII		54,56
MeOH/Acet/Hex	IX		57,46
EtOH/Acet/Hex	X		62,07

Fase estacionária: C-18 Fase móvel: MeOH/CHCl₃ 75:25

Tabela 10 - Extração dos carotenóides de mamão com diferentes solventes

SOLUENTE	CÓDIGO	CAROTENÓIDES TOTAIS (µg.g ⁻¹)	
		EXTR. ORIGINAL	EXTR. HEXANICO
Metanol	I	50,88	52,79
Etanol	II	79,67	81,84
Acetona	III	62,56	66,11
MeOH/Acet	IV	72,62	76,91
EtOH/Acet	V	74,17	78,46
MeOH/Hex	VI		53,89
EtOH/Hex	VII		82,12
Acet/Hex	VIII		71,32
MeOH/Acet/Hex	IX		76,83
EtOH/Acet/Hex	X		81,31

Fase estacionária: C-18 Fase móvel: MeOH/CHCl₃ 75:25

Tabela 11 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba;
fase estacionária C-18

	FM 1	FM 2	FM 3	FM 4
área total	2690	2759	2676	2246
nº picos	6	6	5	5
tempo (min.)	11,44	12,82	14,72	5,45
tr β^* - tr α^{**}	4,52	6,55	6,00	1,80

FM 1 MeOH/CHCl₃ 90:10 (Quackenbush & Smallidge, 1986)

FM 2 CH₃CN/CHCl₃ 92:8 (Hsieh & Karel, 1985; Stepanovitch & Karel, 1982;
Zakaria & Simpson, 1979)

FM 3 MeOH/CH₃CN/CHCl₃ 55:39:6 [Schwartz & Patroni-Killam, 1985; Miller &
Yang, 1985; Broich et al., 1983]

FM 4 CH₃CN/PrOH/H₂O 39:57:4 [Speck et al., 1986; Khachik et al., 1986;
Ruddat & Will, 1985; Will & Ruddat, 1984]

* tempo de retenção do beta-caroteno

** idem, do licopeno

Tabela 12 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba;
fase estacionária *SILICA-DEL*

	FM 5	FM 6	FM 7	FM 8
área total	2834	1925	2139	1861
nº picos	6	6	6	2
tempo (min.)	5,77	9,26	6,77	3,67
tr ^β * - tr ^l **	0,3	—	0,2	—

FM 5 Hex/PrOH 90:10

FM 6 Hex/Acet 80:20 (+0,1% MeOH) [Fiksdahl et al., 1978]

FM 7 Hex/Acet 90:10 [Hajibrahim et al., 1978; Takaji, 1985; Wakazoe,
1982]

FM 8 Hex/PrOH 97:3 (+0,1 % CH₃CN) (Ciappellano et al., 1985)

* tempo de retenção do beta-caroteno

** idem, do licopeno

Tabela 13 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba;
fase estacionária *APUHA*

	FM 2	FM 9	FM 10	FM 6	FM 11	FM 12
área total	3630	3856	3734	4641	4095	4900
nº de picos	3	3	3	4	4	4
tempo (min.)	4,05	3,25	12,21	4,12	4,87	4,98
tr ^{IX} - tr ^{IXX}	—	—	—	0,11	0,13	0,14

FM 2 CH₃CN/CHCl₃ 92:8

9 MeOH/CHCl₃ 80:20

10 Hex/Acet 50:50

6 Hex/Acet 80:20 (+0,1 % MeOH)

11 Hex/PrOH 80:20

12 Hex/PrOH 80:20 (+0,1 % CH₃CN)

* tempo de retenção do beta-caroteno

** idem, do licopeno

Tabela 14 - Separação dos carotenóides de extrato de goiaba:
fase estacionária *CIANO*

	FM 6	FM 7	FM 12	FM 11	FM 10
área total	4937	5159	4667	5217	5361
nº picos	5	7	3	4	3
tempo (min.)	9,57	10,32	4,96	9,14	13,0
tr ^β * - tr ^l **	—	0,14	0,35	—	0,05

FM 6 Hex/Acet 80:20 (+ 0,1 % MeOH)

7 Hex/Acet 90:10

12 Hex/PrOH 80:20 (+ 0,1 % CH₃CN)

11 Hex/PrOH 80:20

10 Hex/Acet 50:50

* tempo de retenção do beta-caroteno

** idem, do licopeno

Na coluna de C-18 as 4 fases móveis testadas mostraram comportamento similar em termos de área total e do número de picos, mas as fases de número 2 e 3 separaram melhor o licopeno do beta-caroteno; a fase de número 2 foi, no entanto, a eleita, pois alia uma boa capacidade de separação a um tempo total de corrida menor.

Na coluna de sílica-gel as 4 fases móveis testadas mostraram ser equivalentes quanto à área total e ao número de picos; a fase 8 mostrou baixa capacidade de separação num tempo de corrida curto; com as fases 5 e 7 conseguiu-se uma separação apenas razoável de beta-caroteno e licopeno num tempo de corrida intermediário, enquanto que a fase 6 não logrou separar os componentes citados num tempo de corrida mais longo.

A coluna de Amina, operando em fase reversa com as 3 primeiras fases, foi ineficaz na separação, inclusive com a fase 10, onde o tempo de corrida foi longo, comparado aos tempos da fase 2 e 9. Utilizando 3 fases de baixa polaridade observou-se uma separação, ainda que tênue, entre os componentes de interesse (apesar de tempos de corridas muito curtos), sendo impossível destacar positivamente uma das fases em particular.

Com a coluna de CN foram testadas somente fases predominantemente apolares ou pouco polares. Apesar da fase número 12 ter permitido a melhor separação entre licopeno e beta-caroteno (e isto num tempo de corrida muito curto), provavelmente não houve eluição de outros componentes (ou houve co-eluição), já que na fase número 7, sete picos diferentes vão aparecendo durante o desenvolvimento do cromatograma. Apesar

da baixa separação entre os picos de licopeno e beta-caroteno com esta fase, ainda assim parece ser a mais eficaz entre as 5 fases testadas.

Uma comparação dos resultados obtidos para cada fase estacionária e respectivas fases móveis favorece amplamente a de C-18, já que com 3 das fases testadas houve pouca variação da área total, separação da maior parte dos componentes principais do extrato, tempo de corrida relativamente curto, mas suficientemente longo para permitir uma boa separação de licopeno e beta-caroteno. A fase de pior desempenho nesta coluna ainda assim superou, com ampla vantagem, quaisquer outros sistemas fase estacionária/fase móvel testados.

4.3 - Teores de Bixina - Norbixina em Sementes de Urucum

Conforme mencionado em 3.3.4, 12 amostras de sementes de urucum foram analisadas de acordo com o método empregado pelo TDRI; alternativamente, as mesmas amostras foram analisadas pelo processo do CTAA. Ambos os métodos utilizam a espectrofotometria no visível para quantificação dos pigmentos.

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos com cada um dos métodos de análise e a estimativa do desvio padrão dessas determinações (e seu correspondente relativo). O valor de F (calculado) é apresentado juntamente com os valores tabelados de F para níveis de confiança de 95 e 99%; de modo análogo, o valor de t (calculado) é comparado com os valores de t (tabelados) para níveis de confiança de 95 e 99%. A análise dos resultados não mostrou diferenças significativas de precisão e demonstrou a equivalência entre os 2 métodos empregados.

Tabela 15 - Teores de carotenóides totais em sementes de urucum:
métodos espectrofotométricos.

carotenóides totais (g / 100g)						
AMOSTRA	método TBEI			método CTA0		
	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
1	2,48	2,48	2,47	2,39	2,35	2,37
2	6,82	6,86	6,84	5,91	5,97	5,94
3	5,47	6,61	5,55	6,86	5,35	5,36
4	6,86	5,96	6,81	6,45	6,26	6,16
5	6,36	6,37	6,36	2,49	6,26	6,37
6	2,61	2,61	2,61	2,47	2,61	2,55
7	2,44	2,48	2,46	2,99	2,61	2,54
8	3,81	3,81	3,81	2,57	2,87	2,93
9	2,52	2,46	2,49	2,57	2,64	2,60
10	2,68	2,82	2,75	2,87	2,85	2,86
11	2,58	2,35	2,42	2,64	2,68	2,62
12	2,63	2,68	2,62	2,46	2,56	2,51
S = 8,06		CV = 1,61%		S = 8,00		CV = 2,14%

$F_c = 1,78$

$\gamma/n_1=n_2=12$ P 95 F = 2,69

P 99 F = 4,48

$t_c = 0,17$

$\gamma/n-1=11$ P 95 t = 2,20

P 99 t = 3,11

Essas mesmas amostras foram analisadas por CLAE (Figura 19) e quantificadas através de método de padronização externa e método de adição de padrão, também não se observando qualquer diferença significativa de precisão e exatidão entre ambos.

A Tabela 16 relaciona os resultados obtidos, os valores de S calculados (e seus correspondentes relativos), apresenta, igualmente, os valores de F e t (calculados) e os compara com os valores tabelados de F e t com níveis de confiança de 95 a 99%.

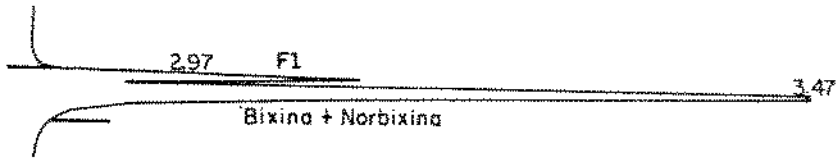
Comparando-se o método espectrofotométrico do CTAA com o de CLAE de adição de padrão, temos:

$S_{CTAA} = 0,25$	$S_{AP} = 0,08$		
$F_c = 9,77$	$p/n_1 = n_2 = 12$	P 95	F = 2,69
		P 99	F = 4,40
$t_c = 1,83$	$p/n - 1 = 11$	P 95	t = 2,20
		P 99	t = 3,11

Observa-se, facilmente, uma diferença significativa de precisão entre os métodos, o que deve ser atribuído aos erros inerentes do processo de CLAE. Tal diferença, no entanto, não se estende ao teste t de Student onde o valor de t (calculado) é menor que o t tabelado para P=95% , devendo-se, portanto, concluir pela equivalência dos resultados.

No caso de urucum, portanto, a CLAE não ofereceu uma vantagem nítida, uma vez que a interferência de outros componentes foi desprezível quando se quantificou os pigmentos totais.

INJECT

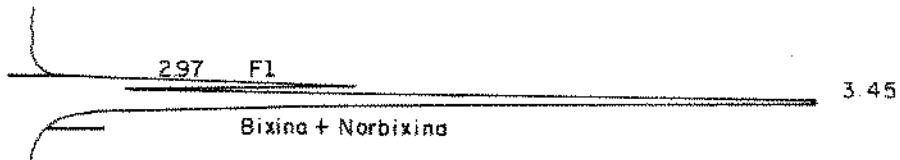


PRESSURE 300.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
DETECTOR 441/050
COLUMN RUN #10 SOLVENT CALC #0 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	1386.93000	2.97		1386939 F	0.000000E0
	7553.52000	3.47		7553558 L	0.000000E0
TOTAL	8940.45000				

INJECT



PRESSURE 300.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
DETECTOR 441/050
COLUMN RUN #11 SOLVENT CALC #0 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	1365.33000	2.97		1365332 F	0.000000E0
	7507.16000	3.45		7507198 L	0.000000E0
TOTAL	8872.49000				

Figura 19 - Cromatograma típico de extrato de urucum.

Tabela 16 - Teores de bixina - norbixina em sementes de araucária:
métodos CLAE

Bixina - norbixina (g / 100g)						
padronização externa				adição de padrão		
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
1	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	2,4
2	5,8	6,3	6,0	6,3	5,7	6,0
3	5,5	5,5	5,5	5,5	5,6	5,6
4	5,8	6,3	6,0	5,7	6,2	6,0
5	6,7	6,2	6,4	6,2	6,5	6,4
6	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	2,6
7	2,7	2,4	2,6	2,7	2,4	2,6
8	2,7	3,0	2,8	3,2	2,8	3,0
9	2,8	2,6	2,7	2,8	2,2	2,5
10	2,5	2,9	2,7	2,6	3,1	2,8
11	2,7	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6
12	2,4	2,6	2,5	2,8	2,4	2,6
S = 0,23			CV = 6,17%	S = 0,25		CV = 6,66%

$F_c = 1,18$

$p/n_1=n_2=12$ P 95 F = 2,69

P 99 F = 4,40

$t_c = 1,17$

$p/n-1=11$ P 95 t = 2,20

P 99 t = 3,11

4.4 - Teores de Provitamina A e Carotenóide Principal de Hortaliças Folhosas

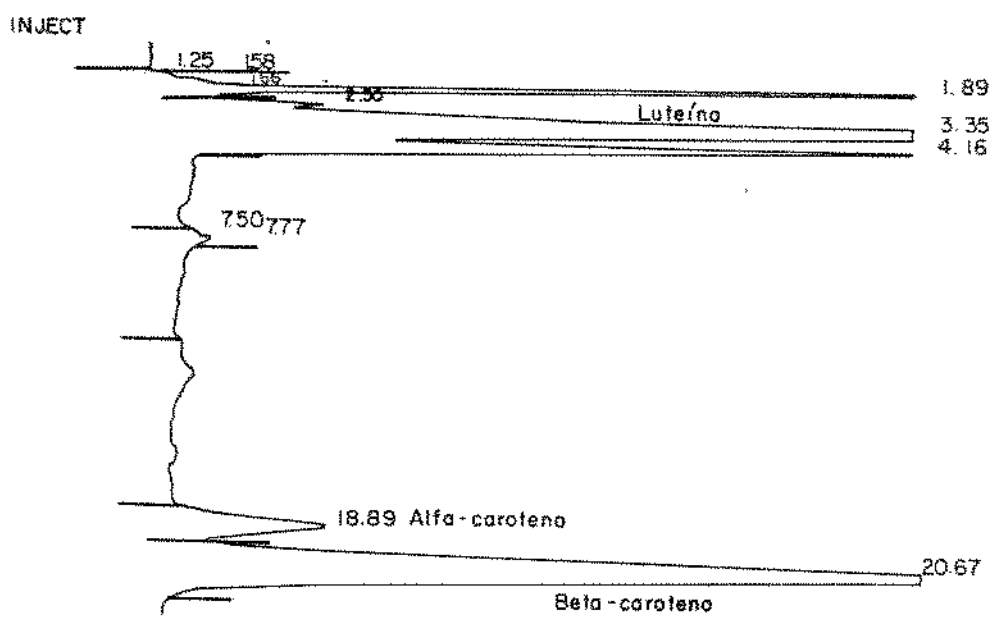
Extratos saponificados e não saponificados de amostras de 5 hortaliças folhosas diferentes foram analisados por CLAE e quantificados pelos métodos já citados em 3.3.3. As Figuras 20 e 21 mostram cromatogramas típicos de extratos de caruru saponificado e não saponificado, respectivamente.

Quando não houve saponificação, os teores de alfa-caroteno, beta-caroteno e luteína, obtidos pelo emprego dos dois métodos, não mostraram diferença significativa: o valor de t (calculado) é menor que o correspondente tabelado para $P=95\%$; tampouco houve diferença de precisão entre os dois métodos quando se determinou os componentes citados, uma vez que F (calculado) é menor que $F=95\%$.

No caso das amostras saponificadas os resultados também mostraram ser equivalentes, não havendo diferença significativa de precisão entre os dois métodos.

As Tabelas 17 a 19 mostram os resultados de análise quando não houve saponificação, enquanto que as Tabelas 20 a 22 referem-se a extratos saponificados.

Note-se que nos extratos não saponificados os valores de S para beta-caroteno, alfa-caroteno e luteína foram, respectivamente, 2,20 , 0,44 e 2,78 (método padrão externo) e 2,60 , 0,56 e 2,89 (método de adição de padrão); nos extratos saponificados encontrou-se, respectivamente, 2,87 , 0,47 e 3,24 (método padrão externo) e 3,29 , 0,87 e 3,34 (método de adição de padrão). Tal fato indica que a etapa de saponificação dos extratos é desnecessária, já que não ocorre nenhum ganho



PRESSURE 500.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/050
 COLUMN RUN # 5 SOLVENT CALC #0 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	36.72600	1.25		36726 F	0.000000E0
	72.81900	1.58		72819 F	0.000000E0
	70.76000	1.66		70760 F	0.000000E0
	6696.47000	1.89		6696505 L	0.000000E0
	351.99500	2.50		351995 HL	0.000000E0
	16331.90000	3.35		16332072 S	0.000000E0
	2836.85000	4.16		2836860 T	0.000000E0
	21.12200	7.50		21122 F	0.000000E0
	95.37900	7.77		95379 L	0.000000E0
	1584.34000	18.89		1584341 L	0.000000E0
	13344.70000	20.67		13344810 L	0.000000E0
TOTAL	41443.10000				

Figura 20 - Cromatograma típico de extrato de caruru, com saponificação.

INJECT

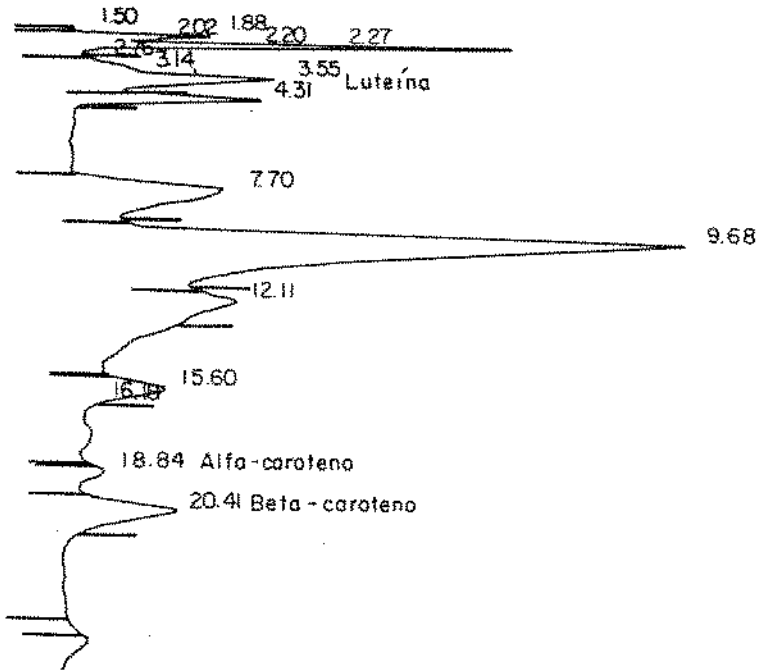


CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/050
 RUN #8 CALC #0
 SOLVENT OPR ID: 7

COLUMN

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	ÁREA	RF
	500.31700	1.88		500317 F	0.000000E0
	67.11100	2.02		67111 F	0.000000E0
	274.44100	2.20		274441 F	0.000000E0
	623.99600	2.27		623996 L	0.000000E0
	5.27600	2.76		5276 F	0.000000E0
	135.79000	3.14		135790 F	0.000000E0
	1155.90000	3.55		1155908 L	0.000000E0
	628.83100	4.31		628831 L	0.000000E0
	2121.56000	7.70		2121567 L	0.000000E0
	9068.45000	9.68		9068495 L	0.000000E0
	699.41000	12.11		699410 L	0.000000E0
	718.16700	15.60		718167 F	0.000000E0
	15.58200	16.18		15582 L	0.000000E0
	1314.52000	20.41		1314523 L	0.000000E0
TOTAL	17329.30000				

Figura 21 - Cromatograma típico de extrato de caruru, sem saponificação.

Tabela 17 - Teores de beta-caroteno em hortaliças folhosas
(sem saponificação)

beta - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
AMOSTRA	padronização externa			adição de padrão		
	X'	X''	X	X'	X''	X
caruru (Alagoas)	125	131	128	128	129	128
ora-pro-nobis	19	19	19	19	19	19
caruru verde	80	76	78	76	83	80
taioã	71	70	70	73	69	71
beirãoega	36	37	36	38	36	37
S = 2,20 CV = 3,31%			S = 2,60 CV = 3,88%			

$F_c = 1,40$

$\nu/n_1=n_2=5$

P 95 F = 5,05

P 99 F = 10,97

$t_c = 1,78$

$\nu/n-1=4$

P 95 t = 2,78

P 99 t = 4,60

Tabela 18 - Teores de alfa-caroteno em hortaliças folhosas
(sem saponificação)

alfa - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa			adição de padrão			
AMOSTRA	\bar{X}	\bar{X}'	\bar{X}	\bar{X}'	\bar{X}'	\bar{X}
caruru (Alagoas)	4,6	4,1	4,4	4,6	4,1	4,4
ora-pro-nobis	16,7	17,1	16,9	16,3	16,2	16,2
caruru verde	8,9	9,1	8,4	9,0	7,5	8,3
taioha	4,8	4,6	4,7	4,3	4,4	4,4
S = 0,44 CV = 5,12%			S = 0,56 CV = 6,81%			

$F_c = 1,64$

$p/n_1=n_2=4$

P 95 F = 6,39

P 99 F = 15,98

$t_c = 2,11$

$p/n-1=3$

P 95 t = 3,18

P 99 t = 5,84

Tabela 19 - Teores de luteína em hortaliças folhosas
(sem saponificação)

luteína ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa			adição de padrão			
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
caruru (Alagoas)	86	83	84	84	85	84
ora-pro-nobis	29	30	30	30	29	30
caruru verde	116	110	113	113	115	114
taioba	110	106	108	105	114	110
belédrega	32	33	32	33	33	33
S = 2,78 CV = 3,77%			S = 2,89 CV = 3,90%			

$F_c = 1,25$

$p/n_1=n_2=5$

P 95 F = 5,05

P 99 F = 10,97

$t_c = 2,32$

$p/n-1=4$

P 95 t = 2,78

P 99 t = 4,60

Tabela 20 - Teores de beta-caroteno em hortaliças folhosas
(com saponificação)

beta - caroteno (ug.g ⁻¹)						
AMOSTRA	padronização externa			adição de padrão		
	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
caruru (Alagoas)	131	124	128	125	130	128
ora-pro-nobis	19	20	20	19	20	20
caruru verde	80	84	82	85	79	82
taioaba	69	70	70	74	70	72
heldroega	36	38	37	39	34	36
S = 2,87 CV = 4,28%			S = 3,29 CV = 4,88%			

F_c = 1,31

$\nu/n_1=n_2=5$

P 95 F = 5,05

P 99 F = 10,97

t_c = 0,83

$\nu/n-1=4$

P 95 t = 2,78

P 99 t = 4,60

Tabela 21 - Teores de alfa-caroteno em hortaliças folhosas
(com saponificação)

alfa - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa			adição de padrão			
AMOSTRA	\bar{X}'	\bar{X}''	\bar{X}	\bar{X}'	\bar{X}''	\bar{X}
caruru (Alagoas)	4,8	3,8	4,3	3,9	4,5	4,2
ora-pro-nobis	15,8	16,3	16,0	15,8	17,5	16,6
caruru verde	8,9	9,6	9,2	9,7	8,6	9,2
taioka	4,5	4,8	4,6	4,3	5,6	5,0
$S = 0,47$ $CV = 5,49\%$			$S = 0,87$ $CV = 9,94\%$			

$F_c = 3,43$

$r/n_1=n_2=4$

P 95 $F = 6,39$

P 99 $F = 15,98$

$t_c = 1,45$

$r/n-1=3$

P 95 $t = 3,18$

P 99 $t = 5,84$

Tabela 22 - Teores de luteína em hortaliças folhosas
(com saponificação)

luteína ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa			adição de padrão			
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
caruru (Alagoas)	87	82	84	87	82	84
ora-pro-nobis	29	31	30	29	30	30
caruru verde	109	118	114	112	116	114
taicoba	109	110	110	105	113	109
belbroega	33	34	34	34	33	34
S = 3,24 CV = 4,37%			S = 3,34 CV = 4,51%			

$F_c = 1,06$

$p/n_1=n_2=5$

P 95 F = 5,05

P 99 F = 10,97

$t_c = 1,32$

$p/n-1=4$

P 95 t = 2,78

P 99 t = 4,60

adicional que possa compensar o tempo demasiadamente longo de preparo de amostra, a possibilidade de perda de quantidade substancial de material nessa fase, além do impedimento de uso de picos adicionais, de quantificação não desejada, como picos de referência no caso do método da adição de padrão.

Comparando-se os resultados obtidos com os dados de hortaliças folhosas de outros países, verifica-se que aos $79\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno, $8,4\mu\text{g.g}^{-1}$ de alfa-caroteno e $114\mu\text{g.g}^{-1}$ de luteína do caruru verde, antepõe-se $19,6\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno do *Amaranthus gangeticus*, da Tailândia (Speek, 1988) e $0,85\mu\text{g.g}^{-1}$ de alfa-caroteno e $24\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno do *Amaranthus spp* da Tanzânia (Pepping, 1988).

As demais hortaliças folhosas estudadas parecem não encontrar similares no exterior.

Comparando-se os resultados com os de hortaliças folhosas do Estado de São Paulo, há boa concordância para 3 das hortaliças estudadas. Os teores de beta-caroteno, alfa-criptoxantina e luteína encontrados para caruru verde foram 110 , 1,3 e $142\mu\text{g.g}^{-1}$; para beldroega foram 30 , 0,6 e $29\mu\text{g.g}^{-1}$ e para taioba foram 67 , 1,01 , e $103\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1990).

A beldroega do Estado do Rio de Janeiro apresentou valores de 36 e $32\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno e luteína, respectivamente, enquanto que na taioba os teores de beta- e alfa-caroteno e luteína foram 70 , 4,6 e $109\mu\text{g.g}^{-1}$. Outra amostra de São Paulo apresentou 65,71 e $17,05\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta- e alfa-caroteno, respectivamente (Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1988).

A quantificação dos carotenóides principais de caruru (Alagoas) e de ora-pro-nobis até o momento parece ainda não ter despertado interesse.

4.5 - Teores de Provitamina A e Carotenóide Principal de Frutos e Produtos Processados

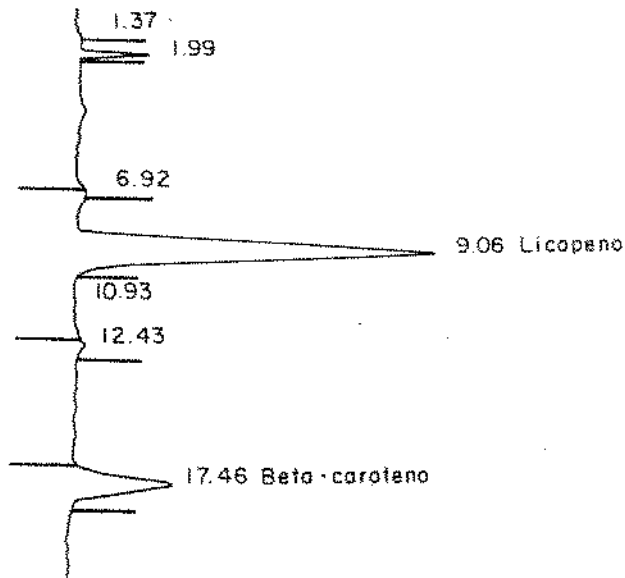
4.5.1 - Goiaba

Os teores de beta-caroteno e licopeno em amostras de goiaba e de alguns de seus produtos processados não escapam ao que se vem observando com os carotenóides de urucum e de hortaliças folhosas, ou seja, não há diferença significativa de precisão quando a quantificação é feita pelo método do padrão externo ou pelo método da adição de padrão, os resultados sendo equivalentes. A Figura 22 apresenta o cromatograma típico do extrato.

As Tabelas 23 e 24 mostram os resultados obtidos pela aplicação dos 2 métodos na quantificação de beta-caroteno e licopeno; apresentam também os valores de S de cada método, o seu equivalente relativo, além de comparar os valores calculados de F e de t com os valores tabelados de F e t para níveis de confiança de 95 e 99%.

Os resultados obtidos mostram boa concordância com os dados da literatura: os valores de 3,7 e 53,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno e licopeno das goiabas variedade IAC-4 de Campinas, São Paulo, e os de 5,5 e 47,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de goiabas do Ceará (Padula & Rodriguez-Amaya, 1986), não contradizem os de 4,2 e 53,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de beta-caroteno e licopeno de goiabas do Estado do Rio de Janeiro.

INJECT



PRESSURE 800.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
DETECTOR 441/050
RUN #13 CALC #0
COLUMN SOLVENT OPR ID 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	158.99300	1.99		158993 L	0.000000E0
	4347.67000	9.06		4347696 L	0.000000E0
	1081.25000	17.46		1081254 L	0.000000E0
TOTAL	5587.91000				

Figura 22 - Cromatograma típico de extrato de goiaba.

Tabela 23 - Teores de beta-caroteno em amostras de goiaba
(e em produtos processados)

beta - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
padronização externa				adição de padrão			
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}	
fruto maduro	1	5,27	5,44	5,36	5,62	5,62	5,62
	2	4,31	3,91	4,11	4,01	4,30	4,16
	3	5,93	5,76	5,84	5,68	5,54	5,61
	4	4,44	4,40	4,42	4,54	4,48	4,51
	5	3,24	3,14	3,19	3,23	3,14	3,18
	6	3,03	3,01	3,02	2,90	3,16	3,03
	7	3,08	3,09	3,08	3,08	3,14	3,11
doce em calda	A	1,94	1,90	1,92	1,64	1,52	1,58
	B	1,70	1,72	1,71	1,17	1,17	1,17
geléia	A	1,67	1,83	1,75	1,82	1,83	1,82
	B	1,40	1,55	1,48	1,46	1,47	1,46
	C	0,47	0,41	0,44	0,48	0,47	0,48
	D	0,59	0,56	0,58	0,67	0,56	0,62
doce em massa	A	4,50	4,52	4,51	4,45	4,55	4,50
	B	3,11	2,79	2,95	3,08	2,95	3,02
saco	A	4,88	4,85	4,86	4,79	4,24	4,52
	B	1,80	1,69	1,74	2,00	1,90	1,99
S = 0,11 CV = 3,67%			S = 0,13 CV = 4,39%				
$\Delta = 0,05$			$\Delta = 0,06$				

$F_c = 1,40$

$\nu/n_1=n_2=17$ P 95 F = 2,27

P 99 F = 3,24

$t_c = 0,91$

$\nu/n-1=16$ P 95 t = 2,12

P 99 t = 2,92

Tabela 24 - Teores de licopeno em amostras de goiaba
(e em produtos processados)

licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
padronização externa				adição de padrão			
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}	
fruto maduro	1	47,4	49,1	48,2	50,7	48,9	49,8
	2	44,8	44,7	44,8	44,2	45,3	44,8
	3	59,1	58,2	58,6	57,7	58,5	58,1
	4	53,5	51,8	52,6	51,9	50,7	51,3
	5	61,6	59,6	60,6	61,3	60,6	61,0
	6	53,2	52,4	52,8	52,6	51,3	52,0
	7	55,8	53,4	54,2	54,1	56,2	55,0
doce em calda	A	28,2	27,4	27,8	28,4	27,2	27,8
	B	29,4	30,4	29,9	33,7	31,8	32,8
geléia	A	23,1	23,4	23,2	23,3	22,6	23,0
	B	13,7	15,2	14,3	14,0	14,5	14,2
	C	16,1	14,2	15,2	14,3	16,0	15,2
	D	11,6	11,4	11,5	11,8	11,5	11,6
doce em massa	A	26,8	27,9	27,4	27,5	25,8	26,6
	B	26,9	26,6	26,8	26,7	26,1	26,4
suco	A	40,8	40,3	40,6	38,5	37,8	38,2
	B	10,8	11,4	11,1	9,5	10,4	10,0
S = 0,83			CV = 2,35%	S = 0,85			CV = 2,42%

$F_c = 1,65$

$p/n_1=n_2=17$ P 95 F = 2,27

P 99 F = 3,24

$t_c = 0,53$

$p/n-1=16$ P 95 t = 2,12

P 99 t = 2,92

4.5.2 - Manga

Nenhuma diferença significativa foi observada quando se quantificou o beta-caroteno de extratos de manga através dos métodos citados: os resultados foram equivalentes, com precisão ligeiramente mais elevada no caso da padronização externa.

A Tabela 25 mostra os resultados obtidos empregando-se os 2 métodos, fornece os valores de S e do CV e compara os valores calculados de F e t com os valores tabelados para níveis de confiança de 95 e 99%. O cromatograma típico do extrato encontra-se na Figura 23.

O teor médio de beta-caroteno em mangas do Estado do Rio de Janeiro, $15,04\text{ug.g}^{-1}$, está em plena concordância com média de 5 variedades de mangas do Estado de São Paulo, onde encontrou-se $14,25\text{ug.g}^{-1}$ de beta-caroteno (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1989).

Comparando esses dados com os resultados de mangas de outros países verificou-se profundas discrepâncias: $0,63\text{ug.g}^{-1}$ de beta-caroteno em mangas da Tailândia (Speek et al., 1988), $23,70\text{ug.g}^{-1}$ do mesmo pigmento em mangas da Tanzânia (Pepping et al., 1988), e $131,2\text{ug.g}^{-1}$ em mangas da costa leste norte-americana (Philip & Chen, 1988).

Tabela 25 - Teores de beta-caroteno em amostras de manga
(e em produtos processados)

AMOSTRA	beta - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	padronização externa			adição de padrão		
	\bar{x}'	\bar{x}''	\bar{x}	\bar{x}'	\bar{x}''	\bar{x}
polpa madura 1	7,9	8,5	8,2	7,8	8,4	8,1
2	8,8	9,8	9,3	9,5	9,7	9,6
3	9,4	8,3	8,8	8,6	9,3	9,0
4	9,0	9,0	9,0	9,0	8,8	8,9
5	10,1	10,1	10,1	10,5	9,8	10,2
6	11,4	11,6	11,5	11,6	11,8	11,7
7	12,1	11,6	11,8	10,8	12,9	11,8
8	14,7	14,4	14,6	14,6	14,6	14,6
9	17,3	16,8	17,0	16,4	17,3	16,8
10	21,2	23,2	22,2	23,6	21,2	22,4
11	28,2	29,2	28,7	28,4	29,3	28,8
12	23,1	23,6	23,4	23,1	22,1	22,6
13	21,1	21,2	21,2	20,5	21,0	20,8
"mango chatney"	1,4	1,1	1,2	—	—	—
doce em calda	17,6	18,1	17,8	18,9	19,0	19,0
suco	A	5,4	5,4	—	—	—
	B	5,0	5,2	—	—	—
S = 0,53		CU = 3,47%		S = 0,71		CU = 4,64%

$F_c = 1,79$

$y/n_1=n_2=17$ P 95 F = 2,33

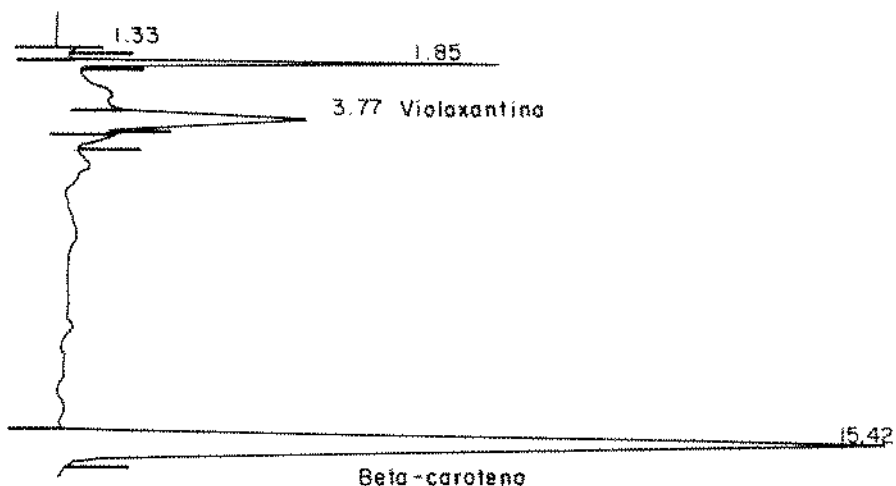
P 99 F = 3,35

$t_c = 0,43$

$y/n-1=13$ P 95 t = 2,16

P 99 t = 3,01

INJECT



PRESSURE 800.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.50 ML/MIN
DETECTOR 441/050
RUN # 7 CALC #0
COLUMN SOLVENT OPR ID 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	713.37500	1.85		713375 L	0.000000E0
	1142.58000	3.77		1142588 L	0.000000E0
	6922.74000	15.42		6922771 L	0.000000E0
TOTAL	8778.70000				

Figura 23 - Cromatograma típico de extrato de manga.

4.5.3 - Tomate

As amostras de tomate e de seus produtos processados não constituíram exceção ao que parece ser uma regra geral: os 2 métodos utilizados na quantificação dos pigmentos levam a resultados equivalentes, tanto sob o ponto de vista do teste F como do teste t.

As Tabelas 26 e 27 relacionam, respectivamente, os resultados da quantificação de beta-caroteno e licopeno, fornecem os valores de S e CV, comparam os valores calculados de F (do licopeno e do beta-caroteno) com os valores tabelados para os níveis de significância considerados; comparam, igualmente, os valores calculados de t (do licopeno e do beta-caroteno) com os valores tabelados para $P = 95\%$ e $P = 99\%$. A Figura 24 mostra um cromatograma típico do extrato.

Para tomates maduros e íntegros, os teores de beta-caroteno e licopeno, $4,30$ e $23,30\text{ug.g}^{-1}$, respectivamente, foram semelhantes aos frutos da Finlândia, $6,60$ e $31,00\text{ug.g}^{-1}$ (Heinonen et al., 1989) e da Hungria $3,49$ e $29,48\text{ug.g}^{-1}$, respectivamente (Urbányi & Horti, 1989), e compatíveis com os $12,86\%$ de beta-caroteno e $73,8\%$ de licopeno (calculado sobre carotenóides totais) também em frutos provenientes da Hungria (Daood et al., 1987); por outro lado, os resultados são bastantes discrepantes quando comparados aos $1,42$ e $7,5\text{ug.g}^{-1}$ de beta-caroteno e licopeno, respectivamente, em tomates norte-americanos (Philip & Chen, 1988; Zakaria & Simpson, 1979).

Em relação aos frutos oriundos do Estado de São Paulo há boa concordância de resultados, sendo os valores ali encontrados, $5,06$ e

Tabela 26 - Teores de beta-caroteno em amostras de tomate
(e em produtos processados)

beta - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa				adição de padrão		
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
fruto maduro I	4,5	4,5	4,5	4,3	4,3	4,3
	2 4,8	4,8	4,8	4,6	4,7	4,6
	3 4,7	5,2	5,0	5,2	4,9	5,0
	4 3,7	3,3	3,5	3,6	3,4	3,5
	5 3,7	4,1	3,9	3,7	4,0	3,8
	6 5,1	5,3	5,2	5,4	5,0	5,2
extrato	A 12,7	11,4	12,0	11,2	12,4	11,8
	B 12,0	11,3	11,6	11,5	12,8	12,2
	C 5,9	5,6	5,8	5,7	5,9	5,8
purê	A 8,8	8,1	8,4	8,2	8,3	8,2
	B 8,0	8,6	8,3	8,4	8,5	8,5
catchup	A 4,9	4,9	4,9	5,1	4,9	5,0
	B 6,0	5,4	5,8	5,8	6,0	5,9
suco	A 2,8	2,6	2,7	2,7	2,8	2,8
	B 1,4	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3
S = 0,34 CV = 6,12%			S = 0,36 CV = 6,14%			

$$F_c = 1,12$$

$$p/n_1=n_2=15 \quad P 95 \quad F = 2,40$$

$$P 99 \quad F = 3,52$$

$$t_c = 0,46$$

$$p/n-1=11 \quad P 95 \quad t = 2,13$$

$$P 99 \quad t = 2,95$$

Tabela 27 - Teores de licopeno em amostras de tomate
(e em produtos processados)

licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
padronização externa			adição de padrão				
AMOSTRA	x'	x''	\bar{x}	x'	x''	\bar{x}	
fruto maduro	1	23,4	23,9	23,6	23,2	23,7	23,4
	2	23,8	23,3	23,6	22,8	23,9	23,4
	3	22,9	24,0	23,4	24,1	22,7	23,4
	4	24,6	24,2	24,4	23,8	23,4	23,6
	5	24,6	23,7	24,2	24,6	23,1	23,7
	6	22,7	22,6	22,3	20,6	20,8	20,7
extrato	A	107,1	106,0	106,6	105,8	107,3	106,6
	B	105,2	107,5	106,4	107,0	105,2	106,1
	C	54,1	52,3	53,2	52,5	54,7	53,6
purê	A	51,3	53,7	52,5	51,0	52,4	51,7
	B	51,4	53,6	52,5	53,7	51,5	52,6
catchup	A	32,6	33,7	33,2	34,6	32,7	33,6
	B	39,3	37,9	38,6	38,9	37,0	38,2
saco	A	18,6	17,8	18,2	20,0	20,1	20,0
	B	14,1	14,0	14,0	14,6	15,4	15,5
		$s = 0,96$	$CV = 2,34\%$			$s = 0,98$	$CV = 2,39\%$

$F_c = 1,04$

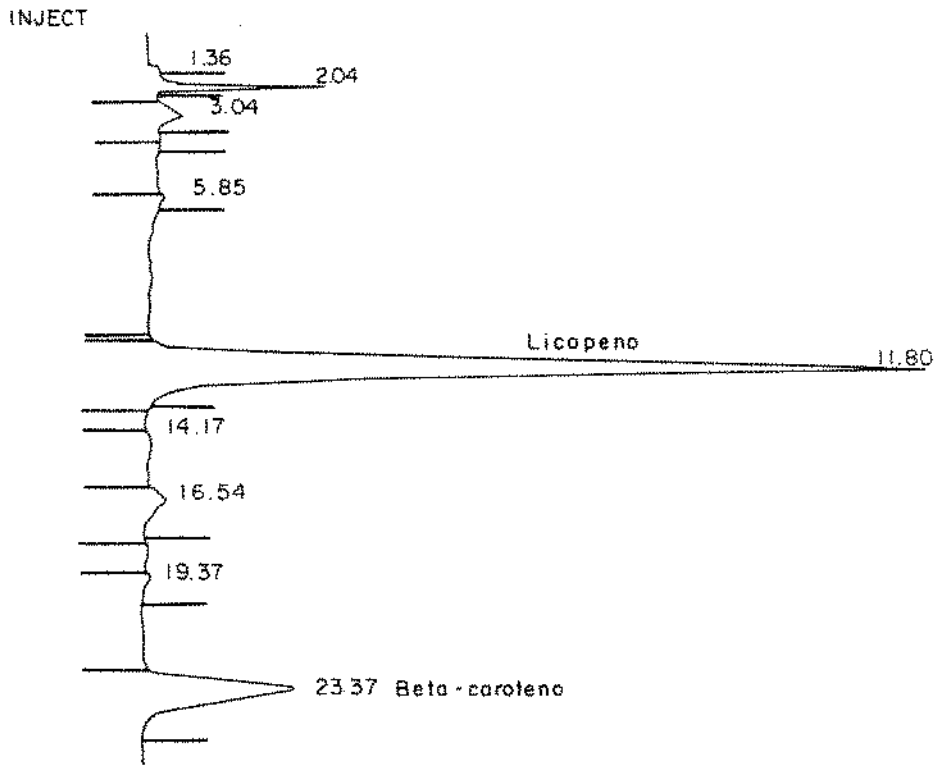
$p/n_1=n_2=15$ P 95 F = 2,40

P 99 F = 3,52

$t_c = 0,46$

$p/n-1=14$ P 95 t = 2,13

P 99 t = 2,95



PRESSURE 800.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/050
 COLUMN RUN #9 SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	411.49900	2.04		411499 L	0.000000E0
	213.21300	3.04		213213 L	0.000000E0
	8200.66000	11.80		8200705 L	0.000000E0
	229.17400	16.54		229174 L	0.000000E0
	2602.39000	23.37		2602399 L	0.000000E0
TOTAL	11656.90000				

Figura 24 - Cromatograma típico de extrato de tomate.

24,82ug.g⁻¹ de beta-caroteno e licopeno (cis- + trans-isômeros) (Tavares, 1991) representando 14,56 e 71,38% dos carotenóides totais, um pouco mais elevados que os encontrados para tomates do Estado do Rio de Janeiro.

Quanto aos produtos processados, o catchup finlandês apresenta 50,00 e 99,00ug.g⁻¹ de beta-caroteno e licopeno, respectivamente (Heinonen et al., 1989), teores mais elevados que o catchup do Rio de Janeiro (5,40 e 35,9ug.g⁻¹, respectivamente) e de São Paulo (4,86 e 94,2ug.g⁻¹, respectivamente) (Tavares, 1991).

Extrato, purê e suco adquiridos no comércio local de Campinas apresentaram teores de beta-caroteno de 10,02 , 6,82 e 2,53ug.g⁻¹ (Tavares, 1991), enquanto que os mesmos produtos adquiridos no comércio da Barra da Tijuca mostraram teores de beta-caroteno de 9,85 , 8,4 e 2,1ug.g⁻¹. Os teores de licopeno encontrados nesses produtos no Rio de Janeiro foram 88,75 , 52,65 e 16,80ug.g⁻¹, enquanto que os de São Paulo mostraram teores mais elevados: 169,0 , 122,7 e 61,6ug.g⁻¹ (Tavares, 1991).

Esta diferença no teor de licopeno pode ser atribuída ao uso de tomates de baixa qualidade tecnológica (tomates de ponteira ou tipo extra) nas pequenas indústrias de beneficiamento de hortaliças do Estado do Rio de Janeiro. Fabricantes paulistas utilizam variedades com alto teor de licopeno, próprias para industrialização.

4.5.4 - Mamão

As amostras de mamão não se constituem em exceção quando quantificadas pelos 2 métodos diferentes: os resultados obtidos para beta-caroteno, beta-criptoxantina e licopeno podem ser considerados equivalentes, apesar de precisão ligeiramente superior no caso da padronização externa.

As Tabelas 28 a 30 relacionam esses resultados, fornecendo ainda os valores de S e de CV, além de comparar os valores calculados de F e t com seus equivalentes tabelados para níveis de confiança de 95 e 99%. As Figuras 25 e 26 mostram cromatogramas típicos de mamão comum e mamão híbrido, respectivamente.

Os teores de beta-caroteno, beta-criptoxantina e licopeno encontrados em amostras de mamão maduro do Estado do Rio de Janeiro, 1,28 , 6,8 e 20,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ respectivamente, são comparáveis aos resultados obtidos de 5 amostras de diferentes frutos maduros do Estado de São Paulo, onde os teores encontrados foram 1,4 , 9,1 e 19,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente, (Kimura et al., 1991).

A literatura informa que o teor de beta-caroteno de mamões da Tanzânia e da Tailândia são, respectivamente, 3,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Pepping et al., 1988) e 0,38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Speek et al., 1987); mamões dos EUA apresentam teores de beta-caroteno e beta-criptoxantina de 9,1 e 12,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (Philip & Chen, 1988).

Tabela 28 - Teores de beta-caroteno em amostras maçã
(e em produtos processados)

beta - caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
padronização externa				adição de padrão			
AMOSTRA	x'	x''	\bar{x}	x'	x''	\bar{x}	
polpa maduro	1	1,55	1,25	1,40	1,32	1,48	1,40
	2	1,12	1,08	1,20	1,33	1,30	1,32
	3	1,80	1,72	1,76	1,86	1,68	1,77
	4	1,25	1,19	1,22	1,13	1,25	1,19
	5	1,59	1,36	1,48	1,41	1,52	1,46
	6	0,83	0,78	0,80	0,82	0,79	0,80
	7	0,87	1,04	0,96	0,97	0,96	0,96
idem, crist	A	7,73	8,34	8,04	7,70	8,33	8,02
	B	7,89	7,50	7,70	7,65	7,00	7,32
	C	6,67	6,85	6,76	6,60	7,10	6,85
polpa verde	8	0,15	0,16	0,16	0,17	0,15	0,16
	9	0,45	0,45	0,44	0,44	0,44	0,44
	10	0,19	0,22	0,21	0,20	0,20	0,20
	11	0,28	0,30	0,29	0,30	0,30	0,30
	12	1,15	1,15	1,15	1,10	1,26	1,18
	13	1,48	1,48	1,48	1,48	1,56	1,52
	14	0,82	0,88	0,85	0,81	0,85	0,83
idem, doce		0,40	0,33	0,36	0,37	0,43	0,40
$S = 0,16$ $CV = 7,91\%$			$S = 0,18$ $CV = 0,96\%$				
$\Delta = 0,06$			$\Delta = 0,09$				

$F_c = 1,19$

$p/n_1=n_2=19$

P 95 $F = 2,17$

P 99 $F = 3,03$

$t_c = 0,55$

$p/n-1=18$

P 95 $t = 2,11$

P 99 $t = 2,90$

Tabela 29 - Teores de beta-criptoxantina em amostras mamoã
(e em produtos processados)

beta - criptoxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
padronização externa				adição de padrão		
AMOSTRA	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}
polpa madara 1	7,9	7,6	7,8	8,3	7,7	8,0
2	7,1	7,1	7,1	6,7	7,4	7,0
3	5,9	5,7	5,8	6,3	5,4	5,8
4	6,7	6,6	6,6	6,8	6,6	6,7
5	7,8	7,3	7,6	7,8	7,7	7,8
6	5,6	5,1	5,4	5,5	5,1	5,3
7	7,4	7,3	7,4	7,1	7,5	7,3
idem, crist. A	20,6	19,3	20,0	21,6	20,0	20,8
B	16,8	16,4	16,6	16,3	15,7	16,0
C	23,4	25,4	24,4	25,1	24,6	24,8
polpa verde 8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8
9	3,1	3,2	3,2	3,1	3,3	3,2
10	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4	1,3
11	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2
12	2,2	2,2	2,2	2,2	2,3	2,2
13	2,2	2,1	2,2	1,9	2,3	2,1
14	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6
idem, doce	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
S = 0,42		CV = 6,25%		S = 0,41		CV = 6,05%

$F_c = 1,05$

$y/n_1=n_2=18$ P 95 F = 2,22

P 99 F = 3,13

$t_c = 1,25$

$y/n-1=17$ P 95 t = 2,11

P 99 t = 2,90

Tabela 30 - Teores de licopeno em amostras marmão
(e em produtos processados)

AMOSTRA	licopeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	padronização externa			adição de padrão			
	X'	X''	\bar{X}	X'	X''	\bar{X}	
polpa madara	1	20,9	20,4	20,6	20,2	21,6	20,9
	2	20,8	19,5	20,2	20,5	21,4	21,0
	3	18,5	16,9	17,7	18,5	17,1	17,8
	4	29,5	27,8	28,6	27,2	28,6	27,9
	5	—	—	—	—	—	—
	6	19,0	18,2	18,6	19,8	17,8	18,8
	7	19,6	18,1	18,8	18,9	19,8	19,4
idem, crist.	A	79,3	77,4	78,4	78,4	76,2	77,3
	B	81,4	79,6	80,5	80,5	81,7	81,1
	C	79,1	80,6	79,8	81,0	79,7	80,4
polpa verde	8	4,8	4,5	4,6	4,6	4,8	4,7
	9	12,8	13,5	13,2	13,5	12,8	13,2
	10	1,8	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6
	11	1,8	1,9	1,8	1,8	1,9	1,8
	12	7,2	7,2	7,2	7,1	7,1	7,1
	13	12,4	12,7	12,6	13,6	12,8	13,2
	14	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
idem, doce	—	—	—	—	—	—	
S = 0,80		CV = 3,17%		S = 0,81		CV = 3,19%	

$F_c = 1,83$

$p/n_1=n_2=16$

P 95 F = 2,33

P 99 F = 3,37

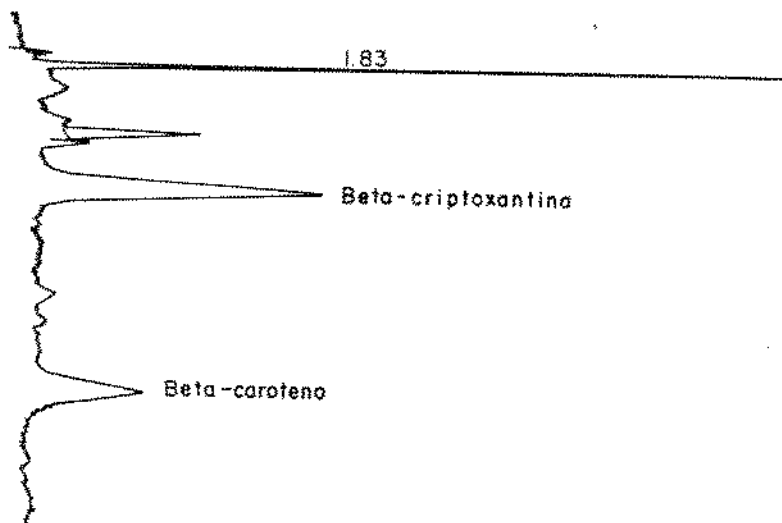
$t_c = 1,29$

$p/n-1=15$

P 95 t = 2,13

P 99 t = 2,95

INJECT

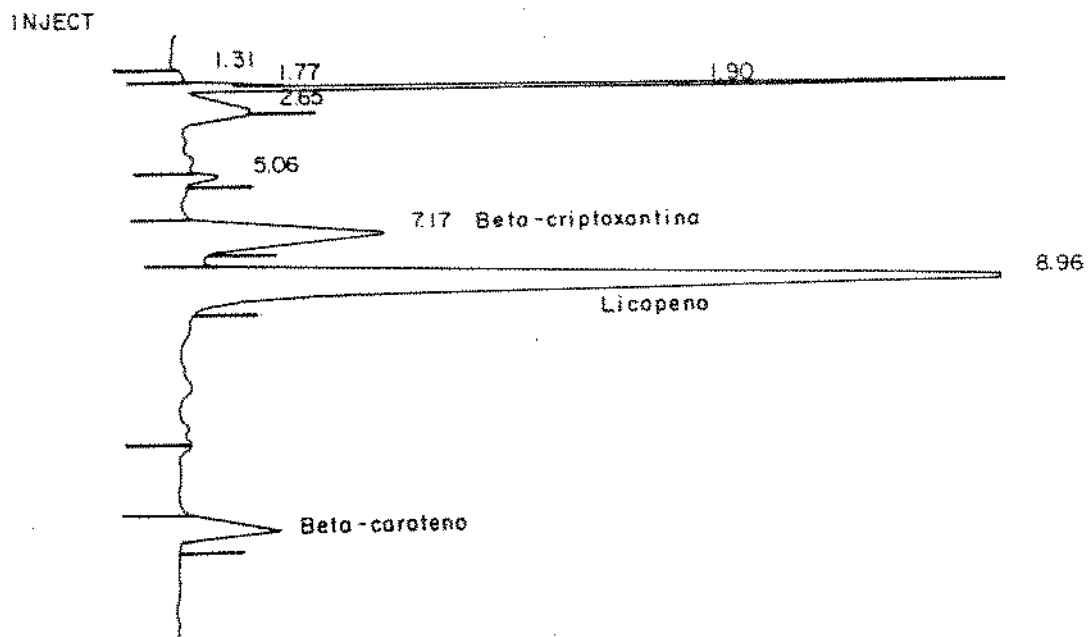


PRESSURE 1000.0 CHART 0.50 CM/MIN FLDW 1.50 ML/MIN
DETECTOR 441/020
COLUMN RUN #6 CALC #0
SOLVENT OPR. ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	385.64300	1.83		385643 L	0.000000E0
TOTAL	385.64300				

Figura 25 - Cromatograma típico de extrato de mamão comum.



PRESSURE 1000.0 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.00 ML/MIN
 DETECTOR 441/050
 RUN #5 CALC #0
 COLUMN SOLVENT OPR ID 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	139.48000	1.77		139480 F	0.000000E0
	1224.70000	1.90		1224704 HL	0.000000E0
	141.82000	5.06		141820 L	0.000000E0
	1925.68000	7.17		1925681 L	0.000000E0
	9119.54000	8.96		9119592 L	0.000000E0
	1067.67400	17.48		1067674 L	0.000000E0
TOTAL	13618.89400				

Figura 26 - Cromatograma típico de extrato de mamão híbrido.

5 - CONCLUSÕES

1 - O método de CLAE mostra ser menos preciso que o espectrofotométrico na determinação dos carotenóides totais do urucum. Por isso, seu uso não deve ser recomendado, a não ser que possa ser aprimorado e fornecer, separadamente, os teores de bixina, de norbixina e de cada um dos componentes amarelos.

2 - No caso de hortaliças folhosas a saponificação é uma etapa desvantajosa, não só pelo tempo relativamente longo dispendido e possibilidade de perda substancial de material durante a passagem para fase hexânica, mas principalmente pela inexistência de picos adicionais de modo a dificultar a quantificação através do método da adição de padrão. O extrato não saponificado mostrou ser adequado para aplicação daquele método, já que existem dois picos adicionais, e de cuja quantificação não se cogita, podendo servir de pico de referência e, desse modo, facilitar a execução da análise ao permitir co-injeção simultânea de três padrões.

3 - Na maior parte das amostras de frutas, a ausência de um pico de referência cria dificuldades para a aplicação do método da adição de padrão já que, além da injeção da amostra, são necessárias duas injeções adicionais, com um pico correspondente a um componente de interesse da amostra servindo como pico de referência para a quantificação de um outro componente de interesse, e vice-versa. Por isso, a comparação das áreas dos componentes de interesse do cromatograma com áreas equivalen-

tes de um padrão externo, injetado logo a seguir, parece ser de execução mais simples e rápida para quantificação dos carotenóides de frutas e seus produtos processados. Necessita, no entanto, de padrões altamente puros, não disponíveis no mercado.

4 - A tão difundida vantagem da rapidez dos métodos por CLAE refere-se apenas à etapa cromatográfica, já que o tempo gasto na obtenção de padrões puros e no preparo da amostra é considerável.

5 - A equivalência dos resultados obtidos por padronização externa e por adição de padrão indica que as variações nas condições cromatográficas em CLAE não são fatores tão marcadamente influentes como na cromatografia gasosa.

6 - A coerência dos resultados obtidos por CLAE, neste estudo, com os obtidos anteriormente, com cromatografia em coluna aberta, demonstra que as duas técnicas podem ser utilizadas, desde que realizadas em condições adequadas.

6 - RECOMENDAÇÃO

Demonstrada a viabilidade de quantificação de provitaminas A e dos carotenóides majoritários através de CLAE, torna-se necessário desenvolver procedimentos pré-cromatográficos simples e rápidos, para que tais componentes possam ser determinados rotineiramente em frutas e hortaliças.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AL-KHALIFA, A.S. & SIMPSON, K.L. Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Comp. Biochem. Physiol., 91 (3): 563-568, 1988.
- 2 - ANGELUCCI, E.; ARIMA, H.K.; MANTOVANI, D.M.B.; FIGUEIREDO, I.B. & MORAES, R.M. Análise química de bebidas não alcoólicas. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1984: 1-9; 127-130.
- 3 - HELRICH, K. (Ed.) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Arlington, Virginia, USA, 15th ed., vol. two, 1990: 834-836.
- 4 - BOWLES, N.D.; PEARL, H.W. & TUCKER, J. Effective solvents and extraction periods employed in phytoplankton carotenoid and chlorophyll determinations. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1127-1131, 1985.
- 5 - BRAUMANN, T. & GRIMME, H. Reverse phase high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. Biochim. Biophys. Acta, 637: 8-17, 1981.

- 6 - BROICH, C.R.; GERBER, L.E. & ERDMAN, J.W. Determination of lycopene, alpha- and beta-carotene and retinil esters in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography. Lipids, 18(3): 253-258, 1983.
- 7 - BUSHWAY, R.J.; YANG, A. & YAMANI, A.M. Comparison of alpha - and beta - carotene content of supermarket versus roadside stand products. J. Food Qual., 9: 437-443, 1986.
- 8 - BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. J. Food Sci., 51: 128-130, 1986.
- 9 - CIAPPELANDO, S.; BRIGHENT, F.; PORRINI, M & TESTOLIN, G. Analisi mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) del contenuto di vitamine A e beta-caroteno di piatti precucinati termicamente trattati. Acta Vitaminol. Enzymol., 7(3-4): 223-228, 1985.
- 10 - CORREA, M.F. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1926, v.1.
- 11 - CORREA, M.F. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1978, v.V.

- 12 - DAODD, H.G.; BIACS, P.A.; HOSCHKE, A.; HARKAY-VINKLER, M. & HADJU, F. Separation and identification of tomato fruit pigments by TLC and HPLC. Acta Aliment., 16(4): 339-350, 1987.
- 13 - DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GODDWIN, T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press, 2nd ed. London, 1976, v.1, cap. 19.
- 14 - DOERFFEL, K. Die statistische Auswertung von Analyseergebnissen. In: (Schormuellers Handbuch der Lebensmittelchemie, v.2, pt.2-Analytik der Lebensmittel), Springer Verlag, Berlin, 1967: 1194-1246.
- 15 - DOWDY, S. & WEARDON, S. Statistics for research. John Willey & Sons, New York, 1983: 173-200.
- 16 - ECKSCHLAGER, K. Errors, measurement and results in chemical analysis. Van Nostrand Reinhold, London, 1972.
- 17 - FIKSDAHL, J.T.; MORTENSEN, J.T. & LIAAEN-JENSEN, S. High-pressure liquid chromatography of carotenoids. J. Chromatogr., 157: 111-117, 1978.
- 18 - FRANCIS, B.J. A rapid method for the analysis of annatto seed. London: Tropical Products Institute, 1970 (não publicado)

- 19 - GEBHARDT, S.E.; ELKINS, E.R. & HUMPHREY, J. Comparison of two methods for determining the vitamin A value of clingstone peaches. J. Agric. Food Chem., 25: 629-632, 1977.
- 20 - GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (Mangifera indica) slices and puree. Int. J. Food Sci. Technol., 22: 451-460, 1987.
- 21 - GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. Lebensm. Wiss. Technol., 22: 100-103, 1989.
- 22 - GOODWIN, T.W. Biochemistry of the carotenoids, Chapman and Hall, London, 2nd ed., 1980, v.1
- 23 - GOODWIN, T.W. & BRITTON, G. Distribution and analysis of carotenoids. In: Goodwin, T.W.(ed). Plant Pigments. Academic Press, London, 1988: 61-132
- 24 - HAJIBRAHIM, S.K.; TIBBETTS, P.C.S.; WATTS, C.D.; MAXWELL, J.R.; EGLINTON, G.; COLIN, H. & GUIOCHON, G. Analysis of carotenoid and porphyrin pigments of geochemical interest by high performance liquid chromatography. Anal. Chem., 50(4): 549-553, 1978.

- 25 - HEINONEN, M.I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E.K.; VARD, P.T. & KOI-
VISTOINEN, P.E. Carotenoids in finnish foods, vegetables,
fruits and berries. J. Agric. Food Chem., 37: 655-659, 1989.
- 26 - HSIEH, Y.P.C. & KAREL, M. Rapid extraction and determination of
alfa- and beta-carotenes in foods. J. Chromatogr., 259:
515-518, 1983.
- 27 - JOHNSON, E.L. & STEVENSON, R. Basic liquid chromatography. Palo
Alto, California, Varian Associates, 1978.
- 28 - KHACHIK, F.; BEECHER, G.R. & WHITTAKER, N.F. Separation, identi-
fication and quantification of the major carotenoid and chlo-
rophyll constituents in extracts of severals green vegetables
by liquid chromatography. J. Agric. Food Chem., 34(4):
603-616, 1986.)
- 29 - KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & YOKOYAMA, S.M. Cultivar dif-
ferences and geographic effects on the carotenoid composition
and vitamin A value of papaya. Lebensm. Wiss. Technol.,
1991, 16pp. (no prelo)
- 30 - LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoid pigments of pho-
tosynthetic biomembranes. Methods Enzymol., 148: 350-382,
1987.

- 31 - MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoids composition and vitamin A value of some brazilian green leafy vegetables. Intern. J. Food Sci. Technol., 25: 213-219, 1990.
- 32 - MILLER, K.W. & YANG, C.S. An isocratic high performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis of plasma retinol, alfa-tocoferol and various carotenoids. Anal. Biochem., 145: 21-26, 1985.
- 33 - MINAZZI-RODRIGUES, R.G. & FENTEADO, M.V.C. Carotenoides com atividade provitamínica A em hortaliças folhosas. Rev. Farm. Biot. Univ. S. Paulo, 25(1): 39-52, 1989.
- 34 - NAKAZOE, J.I. Application of high performance liquid chromatography to the analysis of carotenoid pigments. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48(7) 1007, 1982.
- 35 - PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Characterization of the carotenoids and assessment of vitamin A value of brazilian guavas (Psidium quaiava L.). Food Chem., 20: 11-19, 1986.
- 36 - PEPPING, F. ; VENCKEN, C.M.J. & WEST, C.E. Retinol and carotene content of foods consumed in East Africa determined by high performance liquid chromatography. J. Sci. Food Agric., 45: 359-371, 1988.

- 37 - PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J.D. & SPORN, M.B. Can dietary beta - carotene materially reduce human cancer rates? Nature, 290(5803): 201 -208, 1981.
- 38 - PHILIP, T. & CHEN, T.S. Development of a method for the quantitative estimation of provitamin A carotenoids in some fruits. J. Food Sci., 53(6): 1703-1706, 1988.
- 39 - PHILIP, T. & CHEN, T.S. Quantitative analysis of major carotenoid fatty acid esters in fruits by liquid chromatography: persimmon and papaya. J. Food Sci., 53(6): 1720-1722, 1988.
- 40 - QUACKENBUSH, F.W. & SHALLIDGE, R.L. Non aqueous reverse phase liquid chromatography system for separation and quantitation of provitamin A. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69(1) 767-772, 1986.
- 41 - RAMOS, D.M.R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of the vitamin A value of common brazilian leafy vegetables. J. Micro-nutr. Anal., 3: 147-155, 1987.
- 42 - RANGANATH, D.R. & DUBASH, P.J. Loss of colour and vitamins on dehydration of vegetables. Indian Food Packer, 7-8: 4-10, 1981.

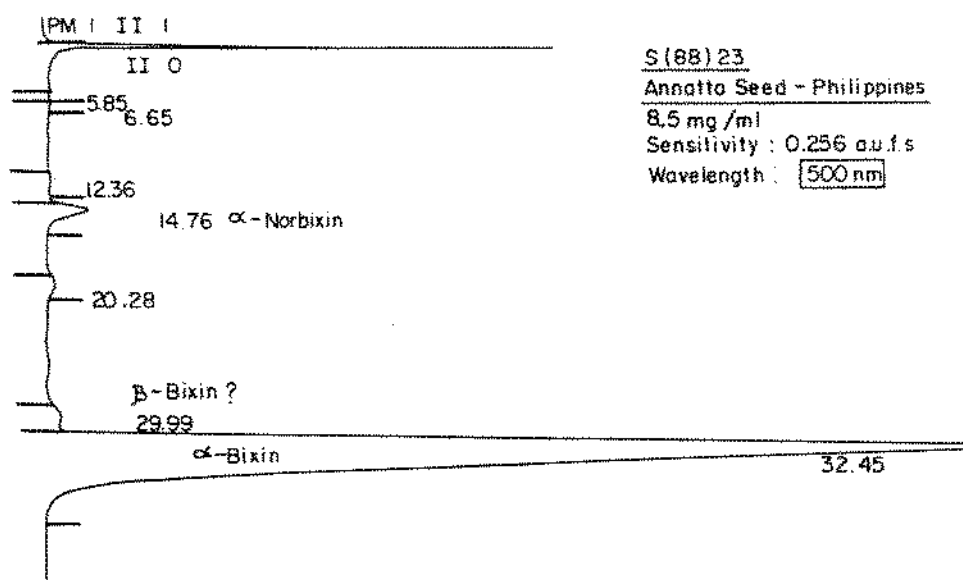
- 43 - REITH, J.F. & GIELEN, J.W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extract. J. Food Sci., 36: 861-864, 1971.
- 44 - RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. BoL. SECTIA, Campinas, 19(4): 227-242, 1985.
- 45 - RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrophotometry. J. Chromatogr. Sci., 26: 624-629, 1988.
- 46 - RODRIGUEZ, D.B. ; RAIMUNDO, L.C. ; LEE, T.C. ; SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening Momordica charantia fruits. Ann. Bot., 40: 615-624, 1976.
- 47 - ROUSEFF, R.L. High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in Turmeric and Annato. J. Food Sci., 53(6): 1823-1826, 1986.
- 48 - RUDDAT, M. & WILL III, D.H. HPLC of carotenoids. Methods Enzymol., 3: 189-200, 1985.
- 49 - SCHWARTZ, S.J. & PATRONI-KILLAM, M. Detection of E/Z-carotene isomers by two dimensional TLC and HPLC. J. Agric. Food Chem., 3: 1160-1163, 1985.

- 50 - SHEKELLE, K.B.; LEPPER, M.; LIU, S.; OGLESLEY, P.; SHRYOCK, A.M. & STAMLER, J. Dietary vitamin A and risk of cancer in Western Electric study. (is)Lancet, 2(8257): 1185-1188, 1985.
- 51 - SIMPSON, K.L. ; TSOU, S.T.C. & CHICHESTER, C.O. Biochemical methodology for the assessment of carotenoids. International Vitamin A Consultive Group, Washington, D.C., 1987, 47pp. (IVACG Report)
- 52 - SIMPSON, K.L. ; GUIMARÃES, I.S.S. & WILBERG, V.C. Separation of bixin and norbixin on a C-18 reverse phase column. University of Rhode Island, Agricultural Experiment Station, Rhode Island, 1991. 8pp. (Publication 2640)(no prelo)
- 53 - SPEEK, A.J. ; SPEEK-SAICHUA, S. & SCHREURS, W.H.F. Total carotenoid and beta-carotene content of Thai vegetables and the effect of processing. Food Chem., 27: 245-257, 1988.
- 54 - SPEEK, A.J. ; TEHALILWA, C.R.G. & SCHRIJVER, J. Determination of beta-carotene content and vit. A activity of vegetables by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. Food Chem., 19: 65-74, 1986.
- 55 - STEPANOVICH, A.F. & KAREL, M. Kinetics of beta-carotene degradation at temperature typical of air drying of foods. J. Food Process. Preserv., 6(4): 227-242, 1982.

- 56 - TAKAGI, S. Determination of green leaf carotenoids by HPLC. Agric. Biol. Chem., 49(4): 1211-1213, 1985.
- 57 - TAVARES, C.A. Composição em carotenóides e valor de vitamina A em tomate, milho e pêssago e seus produtos processados. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 1991, 85pp. Tese de Mestrado, 1991.
- 58 - TIRIMANNA, A.S.L. Study of the carotenoid pigments of Rixa orellana L. seeds by thin layer chromatography. Mikrochim. Acta, II: 11-16, 1981.
- 59 - URBÁNYI, G. & HORTI, K. Colour and carotenoid content of quick-frozen tomato cubes during frozen storage. Acta Aliment., 18: 247-267, 1989.
- 60 - WILL III, D.H. & RUDDAT, M. C-18 reversed phase HPLC analysis of carotenes. Liquid Chromatogr., 2(8): 610-612, 1984.
- 61 - WOOD, A.B. Evaluation of assay procedures for the bixinoid pigments and annatto seeds and their derivatives. National Resources Institute, London, 1988, 31pp. (NRI Interim Report).
- 62 - ZAKARIA, M. & SIMPSON, K.L. Use of reverse-phase high performance liquid chromatography for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. J. Chromatogr., 176: 109-117, 1979.

- APENDICE -

ANNATTO SEED
HPLC at 500 nm



S(88)23
Annatto Seed - Philippines
8.5 mg/ml
Sensitivity : 0.256 a.u.f.s
Wavelength : 500 nm

DATA SAVED TO BIN # 18

ANNATTO ODS-2 MEQH 82% 1.5

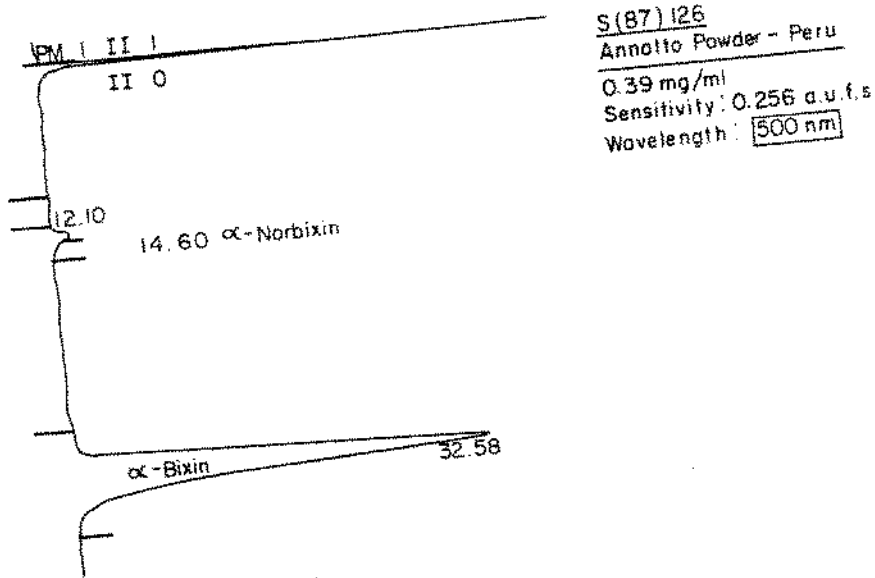
CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 20 INDEX 20 BIN 18

PEAK #	AREA %	RT	AREA BC
1	0.054	5.85	30946 01
2	0.097	6.65	55618 01
3	0.219	12.36	125584 01

Figura 27 - Cromatograma: sementes de urucum - Filipinas .

ANNATTO POWDER - BIXIN TYPE
HPLC at 500 nm



DATA SAVED TO BIN #: 17

ANNATTO ODS-2 MEQH 82%_v1.5

FILE	METHOD	RUN	INDEX
1.	0.	19	19
PEAK #	AREA %	RT	AREA BC
1	0.395	12.10	87889 01
2	2.593	14.60	576239 01
3	97.012	32.58	21561184 01
TOTAL	100.		22225312

CH= "A" PS= 1.
 BIN 17

Figura 28 - Cromatograma : pó de urucum - tipo bixina.