

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Determinação da composição de carotenóides e
antocianinas de camu-camu (*myrciaria dubia*)**

Cinthia Fernanda Zanatta

Prof^a. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Z15d Zanatta, Cinthia Fernanda
 Determinação da composição de carotenóides e antocianinas
 de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) / Cinthia Fernanda Zanatta. –
 Campinas, SP: [s.n.], 2004.

 Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

 1.Carotenóides. 2.Antocianina. 3.Camu - camu.
 I.Mercadante, Adriana Zerlotti. II.Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

CARS-FEA

Banca examinadora:

Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(orientadora)

Dra. Célia Maria de Sylos

Dra. Úrsula M. L. Marquez

Dra. Florinda Orsatti Bobbio

Agradecimentos

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Cláudio e Vera, e minhas irmãs, Káthia e Giuliana, pelo incentivo, pelo apoio incondicional e por permitir que isso tudo fosse possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, pela paciência, dedicação e por todos os ensinamentos nos últimos três anos. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Florinda O. Bobbio, pelo auxílio, paciência e principalmente pelo prazer do convívio e amizade. Obrigada por me ensinar tantas coisas!

Aos colegas de laboratório, Alessandro, Itaciara, Mônica, Veridiana, Tatiana e Maria Ivone, pela ajuda e apoio, sem os quais tudo seria mais difícil. Obrigada pela amizade e por tornarem meu trabalho mais agradável e prazeroso.

Aos funcionários da secretaria do DCA, Jardete, Marquinhos e Marcão, pela assistência e gentileza.

À CAPES pela concessão da bolsa de fomento que tornou possível a realização do trabalho.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
RESUMO.....	XIV
SUMMARY	XVI
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1. Camu-camu	05
3.1.1. Dados botânicos	05
3.1.2. Composição nutricional.....	07
3.1.3. Aplicação e valor econômico	09
3.2. Carotenóides e antocianinas.....	09
3.2.1. Relação entre degradação e estrutura química.....	09
3.2.1.1. Carotenóides.....	09
3.2.1.2. Antocianinas	11
3.2.2. Composição em frutas.....	16
3.3. Análise	20
3.3.1. Carotenóides	21
3.3.2. Antocianinas	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Amostras.....	30

4.1.1. Caracterização.....	30
4.1.2. Amostragem e preparação	32
4.2. Solventes	32
4.3. Equipamentos	33
4.3.1. Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.....	33
4.3.2. Cromatógrafo líquido de alta eficiência para separação semi-preparativa	33
4.3.3. Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV/Visível e espectrômetro de massas	34
4.3.4. Cromatógrafo contra corrente de alta velocidade	34
4.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton.....	34
4.4. Análise de carotenóides.....	34
4.4.1. Extração e saponificação.....	35
4.4.2. Separação semi-preparativa em fase normal	36
4.4.2.1. Preparação das fases estacionárias	36
4.4.2.2. Separação por cromatografia.....	38
4.4.3. Separação por CLAE de fase reversa	40
4.4.4. Análise qualitativa.....	43
4.4.4.1. Comportamento cromatográfico.....	43
4.4.4.2. Espectrofotometria UV/visível	43
4.4.4.3. Derivatizações químicas	44
4.4.5. Análise quantitativa.....	45
4.4.5.1. Padrões.....	45
4.4.5.2. Curvas-padrão	46
4.5. Análise de antocianinas	46

4.5.1. Extração qualitativa	46
4.5.2. Antocianinas totais.....	48
4.5.3. Separação e purificação de antocianinas	48
4.5.3.1. Cromatografia semi-preparativa em papel	48
4.5.3.2. Cromatografia semi-preparativa em coluna	49
4.5.3.3. Purificação semi-preparativa por cromatografia contra- corrente de alta velocidade	50
4.5.3.4. Separação por CLAE-DAD.....	50
4.5.3.5. Separação por CLAE-UV-Visível-EM	51
4.5.3.6. Separação por CLAE semi-preparativa.....	51
4.5.4. Identificação.....	51
4.5.4.1. Comportamento cromatográfico.....	51
4.5.4.2. Espectro UV/Visível.....	53
4.5.4.3. Espectro de massas.....	53
4.5.4.4. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton...	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. Obtenção de padrões.....	54
5.2. Composição de carotenóides de camu-camu	54
5.2.1. Composição qualitativa.....	57
5.2.1.1. Separação por fase normal	57
5.2.1.2. Separação por fase reversa	67
5.2.2. Composição quantitativa.....	86
5.2.2.1. Efeitos geográficos.....	87
5.3. Composição de antocianinas	94
5.3.1. Purificação e confirmação da estrutura	94

5.3.2. Composição quantitativa.....	114
6. CONCLUSÕES	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição de minerais (mg/Kg) em polpa de camu-camu e de acerola.....	08
Tabela 2. Composição nutricional da polpa de camu-camu (g/100 g)	08
Tabela 3. Antocianidinas encontradas na natureza	12
Tabela 4. Composição de carotenóides e antocianinas de diversas frutas	18
Tabela 5. Procedência e data de compra das amostras	31
Tabela 6. Condições avaliadas na saponificação dos carotenóides de camu-camu	37
Tabela 7. Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C ₃₀ ..	41
Tabela 8. Porcentagem de pureza encontrada para os padrões de carotenóides cedidos pela DSM Nutritional Products	47
Tabela 9. Solventes e absortividades utilizados para o cálculo de concentração de padrões de carotenóides	47
Tabela 10. Gradientes das fases móveis utilizadas na análise por CLAE-UV/Vis-MS.....	52
Tabela 11. Características dos carotenóides de camu-camu separados por CCD	62
Tabela 12. Características dos carotenóides de camu-camu separados em coluna de fase reversa C ₁₈	71
Tabela 13. Características dos carotenóides separados em coluna de fase reversa C ₃₀	74
Tabela 14. Composição de carotenóides (µg/100g de casca) e valor de vitamina A (RE/100g de casca) de camu-camu.....	88

Tabela 15. Características, obtidas por CLAE-MS das antocianinas de camu-camu	105
Tabela 16. Características, obtidas por CLAE, das antocianinas de camu-camu	110
Tabela 17. Composição relativa das antocianinas de camu-camu, obtidas por CLAE, e expressas como porcentagem de área do total	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia dos arbustos com caule submerso no rios amazônicos e do camu-camu silvestre.....	06
Figura 2. Frutos de camu-camu.....	06
Figura 3. Estrutura do β -caroteno.....	09
Figura 4. Estrutura do íon flavílium ou 2-fenil-benzopirílium.....	11
Figura 5. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa em diferentes valores de pH.....	15
Figura 6. Fotografia, tirada no laboratório, dos frutos de camu-camu utilizados neste estudo	31
Figura 7. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto saponificado de cenoura	55
Figura 8. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos cristais de β -caroteno após a primeira cristalização (A) e após re-cristalização (B).....	56
Figura 9. Cromatogramas, obtido por CLAE, dos cristais de α -caroteno após a primeira cristalização (A) e após re-cristalização (B).....	56
Figura 10. Estruturas dos carotenos e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu camu	58
Figura 11. Estrutura dos apocarotenóides, carotenóides monoidroxilados e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu-camu.....	59
Figura 12. Estrutura dos carotenóides polioidroxilados e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu-camu.....	60
Figura 13. Esquema da separação dos carotenos de camu-camu.....	61
Figura 14. Esquema da separação de carotenóides monoidrolizados e epóxidos de camu-camu.....	65

Figura 15. Esquema da separação de carotenóides polidroxilados de camu-camu.	66
Figura 16. Cromatograma, obtido por CLAE em coluna de fase reversa C ₁₈ , dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Mirandópolis (06/07/02).....	68
Figura 17. Cromatograma, obtido por CLAE em coluna de fase reversa C ₁₈ , dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Mirandópolis (13.07.03).....	69
Figura 18. Cromatograma, obtido por CLAE em coluna de fase reversa C ₁₈ , dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Iguape (15.05.03)	70
Figura 19. Cromatograma, obtido por CLAE em coluna de fase reversa C ₃₀ , dos carotenóides do extrato saponificado de frutos de camu-camu proveniente de Mirandópolis (06/07/02)	73
Figura 20. Cromatograma, obtido por CLAE, da co-cromatografia do extrato bruto saponificado de camu-camu com padrões de β -apo-8'-carotenal (Pico 1), β -apo-10'-carotenal (Pico 2) e β -apo-12'-carotenal (Pico 3).....	81
Figura 21. Esquema da reação de condensação aldólica entre a acetona e o β -apo-10'-carotenal	82
Figura 22. Gráficos de temperatura referentes a 2003, nas cidades de Mirandópolis (1) e Iguape (2)	91
Figura 23. Gráficos de precipitação pluvial (mm) de 2003, em Mirandópolis (1) e Iguape (2)	91
Figura 24. Esquema do cromatograma do extrato bruto após desenvolvimento por 18 horas em HCl 1%	95
Figura 25. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos bruto (1) e (2); e parcialmente purificado por cromatografia em papel com HCl 1% como fase móvel (3) e (4), processados a 280 nm e 520 nm	96

Figura 26. Esquema do cromatograma em papel do extrato parcialmente purificado, após desenvolvimento por 20 horas em BFW	97
Figura 27. Cromatograma, obtido por CLAE, da fração 3 (Z3) das antocianinas de camu-camu.....	97
Figura 28. Cromatogramas da Z3, obtidos por CLAE, processados no λ_{max} e a 280 nm	99
Figura 29. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos bruto (1) e (2); e parcialmente purificado por cromatografia em coluna de Amberlite XAD-7 (3) e (4), processados a 280 nm e 520 nm	100
Figura 30. Esquema da separação de açúcares, por cromatografia em papel, dos extratos bruto e parcialmente purificado	101
Figura 31. Cromatograma, obtido por HSCCC, do extrato parcialmente purificado de camu-camu.....	101
Figura 32. Cromatograma da F4, obtido por CLAE-MS.....	102
Figura 33. Cromatograma da F5, obtido por CLAE-MS.....	102
Figura 34. Espectros de massas das antocianinas de camu-camu.....	104
Figura 35. Espectros de delphinidina-3-glucosídeo (1) (F4) e cianididina-3-glucosídeo (2) (F5) obtidos por RMN em CD ₃ OD +TFA.....	106
Figura 36. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto de antocianinas de frutos de camu-camu de Mirandópolis	108
Figura 37. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto de antocianinas de frutos de camu-camu de Iguape.....	109
Figura 38. Espectros das antocianinas de camu-camu, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, numerados de acordo com a Tabela 16	111
Figura 39. Espectros das antocianinas de camu-camu, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, numerados de acordo com a Tabela 16	112
Figura 40. Espectros, obtidos pelo DAD, das antocianinas de camu-camu	113

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectros de carotenóides de camu-camu, numerados de acordo com os cromatogramas das Figura 16, 17 e 18 e Tabela 12	137
Anexo 2. Espectros de carotenóides de camu-camu, numerados de acordo com o cromatograma da Figura 19 e Tabela 13.	143
Anexo 3. Espectros de padrões de apocarotenóides, numerados de acordo com o cromatograma da Figura 20	144

RESUMO

O camu-camu (*Myrciaria dúbia*) é uma pequena fruta arredondada, com coloração variando de avermelhada a roxo, que cresce em árvore nativa da região amazônica. Esta espécie tem despertado grande interesse devido ao seu elevado potencial funcional, principalmente por apresentar altos teores de ácido ascórbico, concentrações consideráveis de potássio, além da presença de carotenóides e antocianinas. Os carotenóides e as antocianinas não são apenas pigmentos naturais responsáveis pela coloração atrativa de frutas, flores e vegetais, mas são compostos que também desempenham diversas funções e ações benéficas ao ser humano. Como a composição completa dos pigmentos desta fruta ainda não foi estabelecida, o objetivo do presente trabalho foi separar, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os carotenóides e antocianinas, caracterizar estes pigmentos e quantificá-los. Foram analisados frutos de camu-camu provenientes das cidades de Iguape e Mirandópolis, estado de São Paulo. Combinando a cromatografia em camada delgada e a CLAE em colunas de fase reversa C_{18} e C_{30} , foram isolados 46 carotenóides; destes, 43 tiveram sua identidade confirmada e 3 não foram identificados. A *all-trans*-luteína foi o carotenóide principal encontrado nos frutos de camu-camu, de ambas as regiões, com concentrações equivalentes a $160,5 \pm 93,1 \mu\text{g}/100\text{g}$ nos frutos de Iguape e $601,9 \pm 75,6 \mu\text{g}/100\text{g}$ nos frutos de Mirandópolis, perfazendo 45% e 55% do total de carotenóides, respectivamente. Em seguida apareceram o β -caroteno ($72,8 \pm 60,9 \mu\text{g}/100\text{g}$ e $142,3 \pm 19,4 \mu\text{g}/100\text{g}$), a violaxantina e a luteoxantina, que juntos somaram 27% e 31% do total de carotenóides encontrados nos frutos de Iguape e Mirandópolis, respectivamente. Níveis de carotenóides totais significativamente mais elevados foram observados nos frutos provenientes de Mirandópolis ($1096,4 \pm 198,0 \mu\text{g}/100\text{g}$) em relação ao camu-camu produzido em Iguape ($363,4 \pm 217,4 \mu\text{g}/100\text{g}$). A análise do extrato bruto de antocianinas de camu-camu por CLAE proporcionou a separação de nove antocianinas nas amostras provenientes de Mirandópolis e de apenas seis delas nas amostras provenientes de Iguape, dentre as quais, a cianidina-3-glucosídeo e a delphinidina-

3-glucosídeo foram conclusivamente identificadas por espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons. Ao contrário do que ocorreu com os carotenóides, o camu-camu cultivado em Iguape apresentou teor de antocianinas totais superior ($56,4 \pm 26,7$ mg/100g) ao observado nos frutos de Mirandópolis ($30,1 \pm 5,5$ mg/100g). A cianidina-3-glucosídeo representou 88% do total de antocianinas, nos frutos de ambas as regiões, enquanto que a delphinidina-3-glucosídeo contribuiu com 4% e 5% no camu-camu produzido em Iguape e Mirandópolis, respectivamente.

SUMMARY

Camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a small round fruit native to the Amazon rain forest, which colour changes from red to purple during the ripening process. Due to its high nutritional value, these fruit awareness has increased considerably over the last years, especially because of its huge contents of ascorbic acid, high levels of potassium beyond the presence of carotenoids and anthocyanins. Not only are the carotenoids and the anthocyanins responsible for the attractive colours of flowers, fruits and vegetables, but also for a rainbow of health benefits. As far as we are concerned, there is no available survey regarding the pigments composition of camu-camu. Considering its potential, the aim of this study was to separate, by high performance liquid chromatography, carotenoids and anthocyanins; to identify and quantify them. Camu-camu from two cities located in São Paulo State, named Iguape and Mirandópolis, were analysed. Forty six carotenoids were isolated by TLC and HPLC, using C₁₈ and C₃₀ reversed phase columns. The identity of forty three carotenoids was confirmed and three were not identified. All-*trans*-lutein was the major carotenoid found in camu-camu from both cities and presented the concentrations of $160.5 \pm 93.1 \mu\text{g}/100\text{g}$ for the fruits from Iguape and of $601.9 \pm 75.6 \mu\text{g}/100\text{g}$ for the fruits from Mirandópolis, contributing to 45% and 55% of the total carotenoid content. The following were β -carotene ($72.8 \pm 60.9 \mu\text{g}/100\text{g}$ and $142.3 \pm 19.4 \mu\text{g}/100\text{g}$), violaxanthin and luteoxanthin. Together, these three carotenoids accounted for 27% and 31% of the total carotenoid content found in the fruits produced in Iguape and Mirandópolis, respectively. When comparing camu-camu from both cities, the fruits from Mirandópolis ($1096.4 \pm 198.0 \mu\text{g}/100\text{g}$) presented total carotenoid concentration significantly higher than those from Iguape ($363.4 \pm 217.4 \mu\text{g}/100\text{g}$). The analysis of the anthocyanin crude extract, by HPLC, provided the separation of nine anthocyanins in the samples from Mirandópolis and only six in the samples from Iguape. Two of them, cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside, had their identity confirmed by mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance. In contrast to the carotenoids results, the camu-camu produced in Iguape ($56.4 \pm 26.7 \text{ mg}/100\text{g}$)

presented higher levels of total anthocyanins, in comparison to Mirandópolis fruits (30.1 ± 5.5 mg/100g). Cyanidin-3-glucoside, being the major anthocyanin, contributed to 88% of total content followed by delphinidin-3-glucoside that represented 4% in camu-camu from Iguape and 5% in the fruits from Mirandópolis.

1. INTRODUÇÃO

A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade de um alimento, exercendo uma enorme influência em seu valor estético e servindo de base para a aceitação de uma grande variedade de produtos alimentícios por parte dos consumidores.

A necessidade de atrair a atenção do consumidor para produtos processados levou a indústria de alimentos a considerar a aplicação de corantes como atrativo em seus produtos, tornando-os o mais semelhante possível aos produtos naturais. À medida que alguns corantes sintéticos foram considerados toxicologicamente inadequados ao consumo, houve um grande incentivo à pesquisa, a fim de promover a substituição destes por pigmentos naturais.

O consumo através dos tempos nos permitiu observar que pigmentos naturais como os carotenóides e as antocianinas além de serem inócuos, possuem também propriedades muito especiais e notáveis que formam a base de diversas funções e ações em organismos vivos.

Os carotenóides são compostos, com cor variando do amarelo ao vermelho, e têm seu uso como corante natural conhecido há séculos, através da adição em alimentos de extratos naturais de urucum, açafrão e páprica. São tradicionalmente conhecidos como pigmentos do reino vegetal, mas também são encontrados em animais, algas e microorganismos.

O papel nutricional mais importante e conhecido dos carotenóides, especialmente do β -caroteno, é a sua atividade como pró-vitamina A, sendo que estas constituem a maior fonte de vitamina A da dieta. Mundialmente, os carotenóides contribuem com 68% da ingestão diária de vitamina A e nos países em desenvolvimento este índice chega a 82% (Simpson, 1983).

Outras importantes ações biológicas que têm sido atribuídas aos carotenóides tais como proteção contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas e degeneração macular, bem como a melhora do sistema imunológico foram revisadas e apresentadas por Krinsky (1994). Muitos outros estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de provar que a suplementação diária de carotenóides como luteína e zeaxantina podem prevenir doenças crônicas e degenerativas, carcinogênese, respostas inflamatórias severas, e outras reações induzidas por radiações ultra-violeta (Bone *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003; Granado *et al.*, 2003)

As antocianinas compreendem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis do reino vegetal e são características de angiospermas. As mesmas são responsáveis por conferir, principalmente às flores e a frutos, as colorações laranja, vermelho, violeta e azul, e devido a sua solubilidade em água pode ser facilmente incorporada em matrizes alimentícias (Markakis, 1982).

Além dos atributos relacionados à cor, o interesse pelas antocianinas tem se intensificado devido aos seus possíveis benefícios à saúde. Estes incluem atividade antioxidante (Tamura & Yamagami, 1994; Wang *et al.*, 1997; Degenhardt *et al.*, 2000) que podem reduzir os riscos de doenças coronarianas (Joshi *et al.*, 2001), ação coadjuvante no tratamento de vários tipos de doenças circulatórias que resultam em fragilidade capilar (Wang *et al.*, 1997), propriedades anti-inflamatórias e vaso-protetoras (Lietti *et al.*, 1976; Vincieri *et al.*, 1992), inibição da agregação plaquetária (Morazzoni & Magistretti, 1986), manutenção da permeabilidade vascular (Wang *et al.*, 1997), controle da diabetes e obesidade (Heinonen, *et al.*, 1998; Tsuda *et al.*, 2003), atividade anti-neoplásica (Kamei *et al.*, 1995) e outros possíveis benefícios, a medida que exercem diversas ações em enzimas e em outros processos metabólicos (Wang *et al.*, 1997). Estas propriedades tornam as antocianinas uma alternativa atrativa em relação aos corantes sintéticos.

A Amazônia destaca-se no Brasil como umas das regiões com maior diversidade de plantas e frutos nativos. Neste último grupo encontra-se o camu-camu (*Myrciaria dúbia*), uma pequena fruta arredondada, de coloração variando de avermelhada a roxo, que cresce em uma árvore nativa da região amazônica. Esta espécie tem despertado grande interesse devido ao elevado potencial funcional que possui, principalmente por apresentar altos teores de ácido ascórbico, com concentrações variando de 1.380 mg a 4.000 mg/100 g de polpa seca (Clement & da Silva, 1994; Roque, 1994; Justi *et al.*, 2000), além da presença de carotenóides e antocianinas.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto acima, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a composição de pigmentos de camu-camu.

Utilizando camu-camu procedentes de duas cidades do estado de São Paulo, os objetivos específicos foram:

- (1) estabelecer as condições cromatográficas para separar os carotenóides e as antocianinas, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),
- (2) caracterizar os carotenóides e as principais antocianinas,
- (3) quantificar os carotenóides por CLAE,
- (4) quantificar o total de antocianinas e a sua distribuição por CLAE,
- (5) identificar as principais antocianinas por espectros de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).

3. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

3.1. Camu-camu

O camu-camu (*Myrciaria dúbia* H. B. K. (McVaugh)), também popularmente chamado de caçari ou araçá-d'água é o fruto de um arbusto de pequeno porte pertencente à família *Myrtaceae* e se encontra disperso em quase toda região amazônica. Pode ser normalmente encontrado à beira dos igarapés e rios ou em regiões permanentemente alagadas, onde a parte inferior de seu caule permanece submersa (Figura 1).

A área de distribuição estende-se da região central do estado do Pará até a Amazônia peruana, passando pelos estados do Amazonas, Roraima e Rondônia. Também pode ser naturalmente encontrado nos estados do Maranhão e Tocantins (INPA). Atualmente, entretanto, está sendo experimentalmente cultivado no Vale do Ribeira, no município de Iguape, e na região do baixo Tietê, na cidade de Mirandópolis, ambas no estado de São Paulo. Estas são regiões de mangues e de clima quente e úmido, condições semelhantes às encontradas na Amazônia.

3.1.1. Dados botânicos

A planta que pode atingir até 3 m de altura, possui caule com casca lisa, folhas lisas e brilhantes que são avermelhadas quando jovens e que posteriormente se tornam verdes (Figura 1). Suas flores são brancas e aromáticas e se apresentam aglomeradas em pequenos grupos de 3 ou 4.

Os frutos são arredondados com 10 a 32 mm de diâmetro e possuem coloração vermelho-escura passando à roxo-escuro no final da maturação (Figura 2). A polpa aquosa e ácida envolve de 2 a 3 sementes de coloração esverdeada.



Figura 1. Fotografia dos arbustos com caule submerso nos rios amazônicos e do camu-camu silvestre.



Figura 2. Frutos de camu-camu.

O camu-camu cultivado na região amazônica frutifica de novembro a março, enquanto que a safra dos frutos produzidos no estado de São Paulo ocorre entre maio e agosto.

3.1.2. Composição nutricional

De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), o camu-camu possui alto valor nutritivo, em especial por apresentar elevada concentração de vitamina C. Os teores de ácido ascórbico variam de 2.400 mg a 3.000 mg/100 g de polpa seca para o camu-camu amazônico (Roque, 1994), e de 1.380 mg a 1.490 mg/100 g para frutos produzidos no Paraná (Justi *et al.*, 2000). Estes valores são muito superiores aos encontrados na maioria das frutas, sendo 1,5 vezes superior ao seu maior concorrente, a acerola (1.790 mg/100 g) (Visentainer *et al.*, 1997); quase 20 vezes maior que os valores encontrados por Assunção & Mercadante (2003) em caju ($121 \pm 18,2$ mg/100 g) e atingindo 71 vezes os teores obtidos para a laranja (*Citrus sinensis* L. variedade Valencia late) que foram de 41,95 mg/100 mL de suco (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003).

Em estudos feitos Justi *et al.* (2000) foi determinada a composição de minerais e de macronutrientes na polpa do camu-camu, dados que são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. O mesmo grupo de pesquisadores também estabeleceu a composição de ácidos graxos do camu-camu e encontraram na polpa 52,5% de ácidos graxos poliinsaturados, 35,7% de saturados e 11,8% de monoinsaturados, sendo que o ácido graxo predominante é o α -linolênico correspondendo a aproximadamente 16% do total.

Franco & Shibamoto (2000) determinaram a composição de voláteis do camu-camu e relataram que 98% destes são terpenos, sendo que o composto majoritário foi o α -pineno perfazendo 66% do total, seguido pelo *d*-limoneno com 24%.

Tabela 1. Composição de minerais (mg/Kg) em polpa de camu-camu e de acerola.

Mineral	Acerola ¹	Camu-camu ²
Sódio	69,8	111,3 ± 4,3
Potássio	280,4	838,8 ± 36,2
Cálcio	132,2	157,3 ± 4,4
Ferro	5,5	5,3 ± 0,4
Magnésio	145,7	123,8 ± 8,7
Manganês	7,5	21,1 ± 1,1
Zinco	1,9	3,6 ± 0,1
Cromo	-	-
Cobre	0,2	2,0 ± 0,2
Cobalto	-	0,1 ± 0,0
Cádmio	0,2	0,01 ± 0,0
Chumbo	0,4	0,2 ± 0,0

¹ Fonte: Visentainer *et al.* (1997).

² Fonte: Justi *et al.* (2000).

Tabela 2. Composição nutricional da polpa de camu-camu (g/100 g).

Componentes	Quantidade ¹
Umidade	94,1 ± 0,1
Proteínas	0,4 ± 0,0
Cinzas	0,3 ± 0,0
Fibras	0,1 ± 0,0
Lipídeos	0,2 ± 0,0
Carboidratos	3,5

¹ Fonte: Justi *et al.* (2000).

3.1.3. Aplicação e valor econômico

O camu-camu é uma espécie tipicamente silvestre, que apresenta grande potencial econômico capaz de colocá-lo no mesmo nível de importância de outras frutas tradicionais da região amazônica, como o açaí e o cupuaçu. Apesar de dificilmente serem consumidos *in natura*, devido à elevada acidez, os frutos são tradicionalmente empregados na fabricação de sucos, sorvetes, doces, licores e geléias (INPA). Além disso, os valores de vitamina C encontrados para o camu-camu chamaram a atenção da indústria farmacêutica nacional e internacional para servir como ingrediente na produção de tabletes de vitamina C e de suplementos vitamínicos (Ministério da Agricultura).

3.2. Carotenóides e antocianinas

3.2.1. Relação entre degradação e estrutura química

3.2.1.1. Carotenóides

A estrutura básica dos carotenóides é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro. A principal característica dos carotenóides é um sistema de ligações duplas conjugadas, que corresponde ao cromóforo, e que permite a estes compostos absorver luz na região do visível, como pode ser observado na estrutura do β -caroteno (Figura 3).

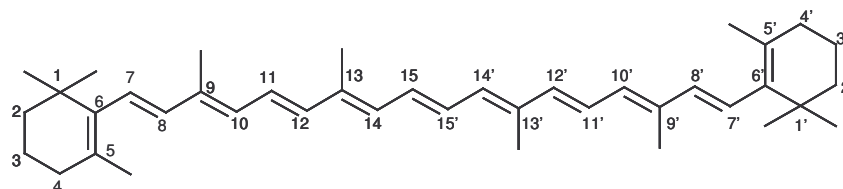


Figura 3. Estrutura do β -caroteno.

Ao mesmo tempo que o sistema de ligações duplas conjugadas confere cor aos carotenóides, este também os torna muito susceptíveis à isomerização e oxidação. Considerando a alta sensibilidade destes pigmentos à luz, calor, oxigênio, ácidos e em alguns casos ao álcali; estas condições devem ser evitadas durante as análises (Davies, 1976).

Os carotenóides são inicialmente divididos em dois grandes grupos, os carotenos que quimicamente são hidrocarbonetos e as xantofilas que são derivados oxigenados. Neste último grupo estão incluídos pigmentos que possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos e/ou epóxidos. Podendo ser também acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Muitas outras modificações estruturais ainda são possíveis permitindo obtenção de uma diversidade de compostos (Britton, 1995).

Por definição, carotenóides naturais são aqueles sintetizados em células vivas ou ainda produtos de transformações metabólicas dos primeiros. Os artefatos são considerados produtos indesejáveis resultantes de reações químicas ou bioquímicas não planejadas. Estes podem ser produzidos a partir de carotenóides naturais antes, durante ou após a extração (Scheidt & Liaaen-Jensen, 1995).

O manuseio impróprio de um material biológico pode provocar reações químicas indesejáveis catalisadas por enzimas ou ácidos existentes nas plantas. Neste último caso, o ácido liberado pode levar ao rearranjo epóxi-furanóxido da molécula, onde 5,6-epóxidos sofrem um rearranjo para 5,8-epóxi-furanóide. Muitas vezes, a fim de prevenir este rearranjo, é feita a adição CaCO_3 ou MgCO_3 para neutralizar a acidez do meio (Scheidt & Liaaen-Jensen, 1995).

3.2.1.2. Antocianinas.

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes à classe dos compostos flavonóides e têm como unidade estrutural básica o cátion flavílium, também denominado como 2-fenilbenzopirílium (Figura 4). Amplamente difundidos na natureza, estes pigmentos são derivados poliidroxilados do íon flavílium e se encontram sempre glicosilados devido a sua grande instabilidade na forma livre (Harborne, 1979). Esta molécula na forma livre, sem a ligação éster com o açúcar, recebe o nome de aglicona ou antocianidina.

Várias combinações químicas entre a estrutura básica C6-C3-C6, e os glicosídeos e/ou ácidos, além da remoção ou adição de grupos hidroxílicos e metoxílicos, são responsáveis pela infinidade de cores observadas em flores e frutos (Harborne, 1967).

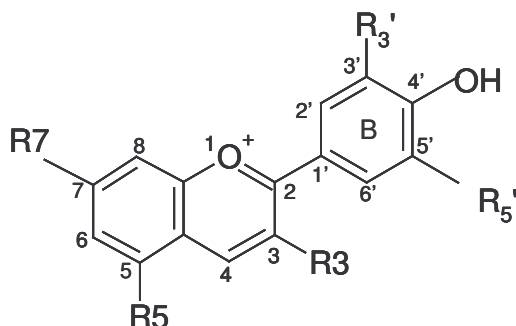


Figura 4. Estrutura do íon flavílium ou 2-fenil-benzopirílium.

Mazza & Miniati (1993), mencionaram a existência de 17 antocianidinas (resumidas na Tabela 3), com diferenças no número e posição dos grupos hidroxilas e/ou metoxilas, porém apenas seis delas são mais freqüentemente encontradas em alimentos. A partir destas 17 estruturas, são formadas as antocianinas, que são as moléculas resultantes da esterificação das antocinidinas com pelo menos uma molécula de açúcar.

Tabela 3. Antocianidinas encontradas na natureza.

Antocianidina	C-3	C-5	C-6	C-7	C-3'	C-4'	C-5'	Cor ^a
Apigenidina	H	OH	H	OH	H	OH	H	L
Aurantidinina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	L
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	VA
Cianidina ^b	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	VL
Delfinidina ^b	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	VA
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	VA
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	VA
6-Hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	-	V
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	L
Malvidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	VA
5-Metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	H	-	VL
Perlaconidina ^b	OH	OH	H	OH	H	OH	H	L
Peonidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	VL
Petunidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	VA
Pulchelidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	VA
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	V
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	V

^a L: laranja, V: vermelho, VL: vermelho alaranjado e VA: vermelho azulado.

^b Antocinidinas mais freqüentemente encontradas na natureza, inclusive nos alimentos.

Fonte: Mazza & Miniati (1993).

A diversidade destes açúcares, bem como, os vários pontos de glicosilação das antocianidinas, elevam consideravelmente o número de antocianinas formadas. Sendo que estas últimas também podem ser classificadas de acordo com o número de açúcares que as constituem (mono, di ou triglicosídeos) (Mazza & Miniati, 1993). Os açúcares mais comuns são os monossacarídeos, tais como glucose, ramnose, arabinose e galactose. Também são encontrados di e trissacarídeos formados pela combinação destes quatro monossacarídeos (Brouillard, 1982).

As antocianinas podem ser glicosiladas pelos diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, com raras exceções, normalmente estão glicosiladas na posição 3. Entretanto, alguns poucos estudos observaram a presença de açúcares em antocianinas, ligados às posições 3', 5' e 7' do anel B (Harborne & Grayer, 1988; Harborne & Williams, 1998), isso se deve porque impedimentos estéricos dificultam a glicosilação nestas posições (Brouillard, 1982).

Já os grupos metoxila normalmente estão presentes nas posições 3' e 5', mas podem ser encontrados com menor frequência nas posições 7 e 5. Nunca foi observada uma antocianina natural que apresentasse, simultaneamente, substituição nas posições 5, 7 e 4', seja por açúcares ou por metoxilas. Isso se deve ao fato de que pelo menos um destes grupo hidroxila deve permanecer livre, por serem essenciais para a formação da base quinoidal ou anidrobases. Esta estrutura colorida é a responsável pela pigmentação de muitas flores e frutos (Brouillard, 1982).

Em muitos casos, os açúcares das antocianinas estão acilados por ácidos orgânicos, os quais estão, normalmente, ligados ao carbono 3 do açúcar (Brouillard, 1982). Os ácidos aromáticos mais comumente encontrados são o cumárico, cafeíco, ferúlico e p-hidroxibenzóico; e dentre os alifáticos são observados com maior frequência o sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico (Mazza & Brouillard, 1987).

É importante ressaltar que as substituições de grupos hidroxílicos e metoxílicos exercem grande influência na coloração do pigmento. O aumento do número de grupos hidroxílicos no anel B tende a conferir ao pigmento coloração mais escura, o que é comprovado por um deslocamento batocrômico no comprimento de onda máximo de absorção do espectro do pigmento. Por outro lado, o aumento no número de metoxilas reverte esta tendência (Harborne, 1967). Com base nos dados descritos acima, não é difícil de entender como a enorme variedade de cores observadas na natureza pode ser produzida a partir de uma única estrutura.

Apesar de raros, já foram relatados pigmentos com mais de três unidades de açúcares, como o “heavenly blue”, antocianina encontrada nas pétalas de *Ipomea tricolor* (Goto, 1987), sendo que nestes casos, os açúcares podem estar ligados à antocianidina através de ligações alternadas entre o açúcar e o ácido orgânico presente na molécula (Francis, 1982).

Outro efeito da glicosilação é conferir à antocianina maior estabilidade e solubilidade em água (Timberlake & Bridle, 1966; Harborne, 1979) quando comparada às antocianidinas. Partindo deste princípio, Mazza & Miniati (1993) comprovaram que a malvidina-3,5-diglucosídeo e a peonidina-3,5-diglucosídeo eram relativamente mais estáveis do que seus correspondentes 3-glucosídeos. Iacobucci & Sweeney (1983) determinaram que o tempo meia vida cianidina-3-rutinosídeo em pH 2,8, à temperatura ambiente, foi de 65 dias, enquanto que o da aglicona cianidina foi de apenas 12 h nas mesmas condições.

Outro fator extremamente relevante na estabilidade e na coloração apresentada pelas antocianinas é o pH. Quatro espécies de antocianinas existem em equilíbrio em soluções ácidas ou neutras: a base quinoidal ou anidrobases (A e A⁻); o cátion flavílium (AH⁺); pseudobase, carbinol ou hemiacetal e chalcona (Figura 5) sendo as duas primeiras coloridas e as outras duas incolores (Brouillard, 1988).

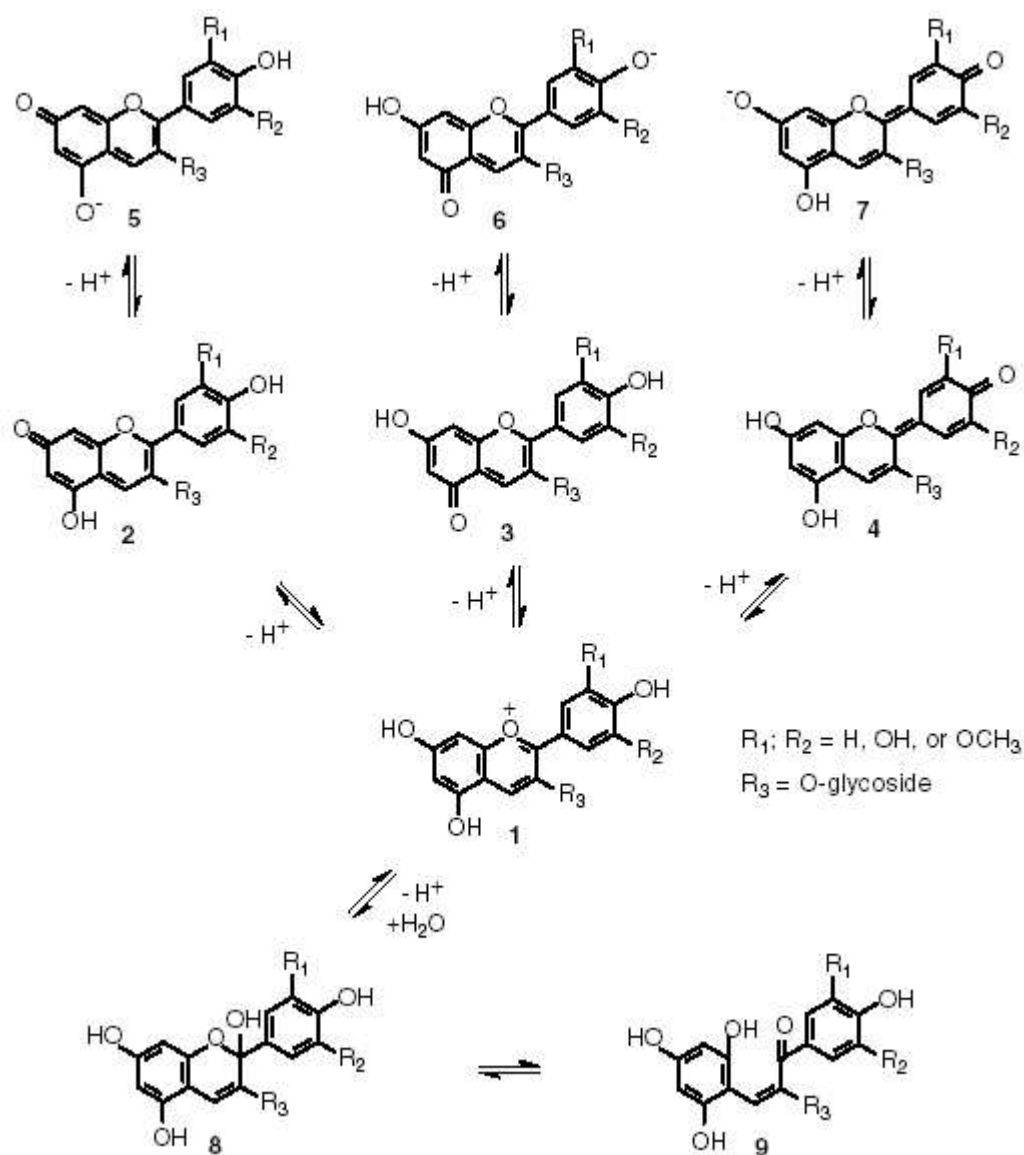


Figura 5. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa em diferentes valores de pH. 1: cátion flavílium; 2 a 4: base quinoidal neutra; 5 a 7: base quinoidal ionizada; 8: pseudobase ou carbinol; e 9: chalcona.

Outros compostos co-existem com as antocianinas participando do processo que confere coloração às plantas, atuando como co-pigmentos, ou seja, são substâncias que colaboram com a coloração ao proteger as moléculas de antocianinas. O mecanismo de co-pigmentação é exclusivo das antocianinas, e tem a função de aumentar sua estabilidade frente a fatores ambientais.

Foram observados dois mecanismos de co-pigmentação: a co-pigmentação intermolecular, caracterizada pela interação entre a antocianina e o co-pigmento, sendo que estes últimos incluem uma grande variedade de compostos presentes nos vegetais, tais como flavonóides, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos e as próprias antocianinas (Osawa, 1982; Mazza & Brouillard, 1990). O segundo mecanismo, denominado de co-pigmentação intramolecular só ocorre em antocianinas que contém dois ou mais grupos acil aromáticos, sendo considerada mais eficiente que a anterior. Acredita-se que os grupos acil interagem com a estrutura básica da antocianina impedindo a formação de um composto hidratado, ou seja, protegem o cátion flavílium do ataque nucleofílico da molécula de água (Brouillard, 1982; Baublis & Berber-Jiménes, 1995; Saito, *et al*, 1995).

Malien-Aubert *et al.* (2001) relatou um grande aumento da estabilidade das antocianinas de algumas variedades de uvas que apresentaram maior proporção copigmento/pigmento em relação às variedades de menor proporção. Comprovaram também maior estabilidade das antocianinas aciladas de repolho roxo, rabanete e cenoura roxa frente à aquecimento em relação as antocianinas não aciladas de uvas e outras frutas de clima temperado.

3.2.2. Composição em frutas

Dos mais de 600 carotenóides isolados e identificados na natureza (Straub, 1987; Kull & Pfander, 1995; Mercadante & Egeland, 2004), somente cerca de 70 foram listados como presentes em frutas, mas ainda assim a sua composição é considerada complexa (Gross, 1987).

A composição de carotenóides de várias frutas tropicais, tais como cajá (Hamano & Mercadante, 2001), caju (Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981, Assunção & Mercadante, 2003), mamão papaya (Kimura *et al.*, 1991), maracujá (Silva & Mercadante, 2002a) e pitanga (Cavalcante & Rodriguez-Amaya, 1992) já foi determinada, mas ainda existem muitas outras cujas composições devem ser estabelecidas.

A composição de antocianinas de diversas frutas, especialmente as de clima temperado, também foi estudada ao longo dos anos. Recentemente, pesquisadores re-avaliaram a composição de antocianinas de frutas como blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) (Nielsen *et al.*, 2003), cereja azeda (*Prunus cereus*) (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004) e framboesa (*Rubus ideaus* L.) (Ancos *et al.*, 2000) utilizando técnicas mais modernas.

A Tabela 4 apresenta algumas frutas cujos pigmentos, carotenóides e antocianinas, foram investigados. Devido à grande diferença estrutural entre carotenóides e antocianinas, não é surpresa que poucos pesquisadores tenham determinado a composição de ambos pigmentos na mesma amostra.

Bobbio *et al.* (1983) e Rodriguez-Amaya *et al.* (1983) pesquisaram em conjunto a composição de carotenóides e antocianinas do “tomate mineiro” (*Cyphomandra betaceae*) e encontraram criptoxantina, β -caroteno, malvidina-3-diglucosídeo e peonidina-3-diglucosídeo, respectivamente, como pigmentos majoritários (Tabela 4).

Sian & Ishak (1991) determinaram os teores de carotenóides e antocianinas em mamão e abacaxi. Entretanto, os pigmentos não foram quantificados separadamente e as concentrações totais foram estimadas por espectrofotometria. O teor de carotenóides foi expresso como β -caroteno e o de antocianinas como cianidina-3-galactosídeo. Também não foi realizada a identificação dos pigmento

Tabela 4. Composição de carotenóides e antocianinas de diversas frutas.

Frutas	Carotenóides Principais	Referências	Antocianinas Principais	Referências
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	β -caroteno (1,6) ^a luteína (0,9) ^a	Silva & Mercadante (2002b)	Cy-3-arab (nd) Cy-3-arab-arab (nd)	Bobbio <i>et al.</i> (2000)
Ameixa (<i>Prunus domestica</i> L.)	β -caroteno (nd) <i>cis</i> -violaxantina (nd)	Gross (1984)	Cy-3-rut (45) ^b Cy-3-glu (37) ^b	Hong & Wrolstad (1990)
Amora preta (<i>Rubus</i> ssp.)	luteína (nd)	Curl (1964)	Cy-3-glu (57) ^b Cy-3-rut (30) ^b	Hong & Wrolstad (1990)
Cereja doce (<i>Prunus avium</i>)	luteína (nd) <i>cis</i> -violaxantina (nd)	Gross (1985)	Cy-3-rut (85) ^b Cy-3-glu (8) ^b	Chaovanalikit & Wrolstad (2004)
Cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.)	luteína (nd) violaxantina (nd)	Curl (1964)	Pn-3-gal (nd) Pn-3-arab (nd)	Wang & Sporns (1999)
Tomate mineiro (<i>Cyphomandra</i> <i>betaceae</i>)	criptoxantina (23,0) ^a β -caroteno (16,7) ^a	Rodriguez-Amaya <i>et al.</i> (1983)	Mv-3-glu-glu (nd) Pn-3-glu-glu (nd)	Bobbio <i>et al.</i> (1983)
Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>cis</i> -violaxantina (22,4) ^b zeaxantina (20,6) ^b	Mouly <i>et al.</i> (1999)	Cy-3-glu-6'-mal (44,8) ^b Cy-3-glu (33,6) ^b	Lee (2002)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	violaxantina (21,1) ^a β -caroteno (15,1) ^a	Mercadante <i>et al.</i> , (1997b)	Pn-3-gal (nd)	Proctor & Creasy (1969)
Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> L.)	ζ -caroteno (7,8) ^a β -caroteno (4,5) ^a	Silva & Mercadante (2002a)	Dp-3-glu (nd)	Harborne (1967)

Morango (<i>Fragaria ssp.</i>)	luteína (nd)	Gross (1982)	Pg-3-glu (89,3) ^b Pg-3-rut (7,5) ^b	Garcia-Vigueira <i>et al.</i> (1999)
Pera (<i>Pyrus comunis</i>)	luteína (nd) β -criptoxantina (nd)	Tan <i>et al.</i> (1999)	Cy-3-gal (nd) Pn-3-gal (nd)	Dussi <i>et al</i> (1995)
Red Currant (<i>Ribes rubrum</i> L.)	luteína (nd) β -caroteno (nd)	Gross (1982/83)	Cy-3-glu (40,6) ^b Cy-3-sam (23,7) ^b	Maata <i>et al.</i> (2003)

^a Teores expressos em $\mu\text{g/g}$.

^b Teores expressos em %.

Cy – cianidina, Pn – peonidina, Mv – malvinidina, Pg – pelargonidina, Pt – petunidina, Dp – delphinidina, glu- glucose, ram-ramnose, gal – galactose, rut – rutinose, sam - sambubiose, xyl – xilose, arab – arabinose, mal- ác. malônico. nd :não determinado.

Andrade (1991) encontrou em camu-camu, em diferentes estádios de maturação, teores de carotenóides totais variando de 0,14 a 0,29 mg/100 g de polpa integral. Os teores de antocianinas totais não foram calculados, sendo os resultados expressos em absorvância a 535 nm por g de fruto.

Recentemente, Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004) avaliaram a composição qualitativa de carotenóides de camu-camu por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas (MS) e encontraram luteína como o carotenóide majoritário, seguido de β -caroteno e zeaxantina. A presença de neoxantina, β -criptoxantina, 5,6-epóxi- β -caroteno também foi observada, porém em pequenas quantidades. Contudo, estes pigmentos não foram quantificados.

Não foram encontradas informações na literatura sobre a composição qualitativa de antocianinas de camu-camu. Entretanto, dados obtidos por Zapata & Dufour (1993) indicaram a presença de antocianinas em camu-camu, após a análise de seu extrato por espectrofotometria. O espectro obtido apresentou uma banda de absorção característica com comprimento de onda máximo de 517 nm.

3.3. Análise

Como os alimentos são considerados uma matriz complexa, a cromatografia tornou-se uma etapa indispensável na análise dos mesmos, tanto para remover substâncias interferentes como para separar os compostos de uma mesma família, possibilitando a sua posterior identificação e quantificação individual.

Tanto a análise de carotenóides quanto a de antocianinas é considerada difícil, principalmente devido ao grande número de pigmentos detectados na natureza, à grande variação qualitativa e quantitativa desses compostos em alimentos, à larga faixa de concentração destes pigmentos e à sua instabilidade durante análise ou estocagem de alimentos. Além disso, outra dificuldade para a quantificação de carotenóides e antocianinas por CLAE é a

existência de poucos padrões comerciais e a pureza variada dos disponíveis. Os padrões dos pigmentos que não são comercializados, normalmente são obtidos de fontes naturais ricas nos mesmos. Diante destas dificuldades, não é surpresa que em vários estudos a quantificação absoluta de cada pigmento não foi feita, e os resultados foram expressos em porcentagens relativas de área ou da concentração total.

É importante ressaltar que por possuírem características estruturais muito diferentes, cuidados especiais devem ser tomados durante a análise de carotenóides e antocianinas. A estabilidade das antocianinas em meio ácido, torna necessário que a análise das mesmas seja realizada em valores baixos de pH. Assim sendo, deve-se evitar ao máximo a análise de ambos pigmentos no mesmo ambiente, pois o contato dos carotenóides com ácidos pode induzir a sua degradação. Assim como, a degradação das antocianinas pode ser provocada pelo contato com o álcali utilizado na saponificação de carotenóides (Harborne, 1967).

5.3.1. Carotenóides

A escolha dos melhores solventes para extração de carotenóides depende muito da amostra analisada, do seu processamento e da composição de carotenóides. Solventes orgânicos miscíveis com a água, como a acetona, normalmente são empregados na extração de amostras frescas, enquanto que amostras secas ou liofilizadas podem ser extraídas com solventes imiscíveis com a água, tais como acetato de etila ou éter etílico (Mercadante, 1999b).

Durante a extração e análise dos carotenóides os artefatos mais comumente encontrados são os isômeros geométricos formados em solução por estereoisomerização, a qual é promovida pela exposição ao calor, luz, ácidos, etc., sendo que os carotenóides mais susceptíveis a este processo são os de cadeia alifática. A extração cuidadosa e rápida, na ausência de luz; e à baixa temperatura pode prevenir isomerizações indesejadas (Scheidt & Liaaen-Jensen, 1995).

A saponificação é freqüentemente empregada para facilitar o processo de isolamento dos carotenóides, com a finalidade de remover clorofilas ou outros materiais saponificáveis. As xantofilas presentes em frutas, normalmente se encontram esterificadas com diferentes ácidos graxos, e o uso da saponificação permite que separação cromatográfica, identificação e quantificação das mesmas se tornem mais fáceis (Mercadante, 1999b). Wingerath e colaboradores (1996) constataram isto na análise de carotenóides em extrato de tangerina, onde a separação cromatográfica do extrato não saponificado apresentou grandes quantidades de β -criptoxantina livre, além seis ésteres deste carotenóide principal. Após a saponificação a separação tornou-se muito mais simples, detectando apenas a presença de β -criptoxantina livre.

Entretanto, o tratamento com álcali pode causar reações indesejáveis como hidrólise de ésteres de carotenóis, condensação aldólica, reação que produz cetonas a partir de apocarotenais, desidratação, entre outras. Podendo, novamente, haver a produção de grande número de artefatos (Scheidt & Liaaen-Jensen, 1995).

Muitos estudos foram realizados para avaliar os efeitos e a eficiência da saponificação na análise de carotenóides. Kimura *et al.* (1990) reavaliaram os efeitos deste procedimento e verificaram a formação de artefatos como isômeros *cis*, epóxidos e produtos de reações com álcali durante o mesmo, além de resultar em degradação e perda de alguns carotenóides. Oliver *et al.* (1998), relataram que a perda de carotenóides durante a saponificação varia de acordo com o tipo de alimento analisado. Foi observada maior perda de carotenóides como capsaxantina e β -caroteno em alimentos industrializados, processados e ricos em gordura como salsichas em relação à alimentos frescos como a páprica.

Embora o método cromatográfico mais utilizado atualmente para a separação de carotenóides seja a cromatografia líquida de alta eficiência, esta técnica está sujeita a fontes de erro tais como incompatibilidade do solvente de injeção com a fase móvel, identificação equivocada, impureza e instabilidade dos

padrões, quantificação de picos não separados na linha de base, entre outros (Khachik *et al.*, 1989; Konning & Roomans, 1997; Kimura & Rodriguez-Amaya, 1999).

Diversos artigos sobre a aplicação da CLAE em análise de carotenóides podem ser encontrados na literatura, porém a grande maioria visa somente a separação de carotenóides. Poucos estudos dedicam-se à quantificação. Isto pode ser explicado devido à complexidade de composição qualitativa de carotenóides, o que torna difícil a separação completa destes pigmentos.

As colunas de fase reversa C₁₈ são as mais utilizadas para análise de carotenóides, principalmente devido às interações hidrofóbicas fracas entre os carotenóides e a fase estacionária; a compatibilidade desta com a maioria dos solventes utilizados e com a faixa de polaridade dos carotenóide, além de sua disponibilidade comercial. Outra vantagem da fase estacionária de C₁₈, é que esta tem demonstrado excelente seletividade na separação de carotenóides (Bushway, 1985; Quackenbush & Smallidge, 1986; Lesellier *et al.*, 1989; Craft *et al.*, 1990 e Oliver & Palou, 2000).

Normalmente, os solventes utilizados na separação de carotenóides são acetonitrila e metanol. Embora a acetonitrila seja amplamente empregada por sua seletividade, baixa viscosidade e por promover separação mais eficiente de xantofilas em colunas C₁₈ monoméricas (Khachik *et al.*, 1986) quando comparada ao metanol, Epler *et al.* (1992) mostraram que na maioria das 65 colunas testadas a recuperação dos carotenóides foi maior com metanol. Além disso, o metanol apresenta outras vantagens como custo mais baixo e menor toxicidade. A associação de outros solventes como acetato de etila, solventes clorados, tetraidrofurano, hexano entre outros permitem a obtenção da retenção desejada, o aumento da solubilidade dos carotenóides, bem como a melhora da resolução.

Recentemente, foi desenvolvida uma coluna C₃₀ polimérica (marca YMC) que além de proporcionar separação mais eficiente dos carotenóides na

linha de base, possibilitou também a separação de isômeros de β -caroteno e β -criptoxantina, não separados anteriormente (Sander *et al.*, 1994; Emenhiser *et al.*, 1996). Breipthaupt & Schwack (2000) utilizaram uma coluna de fase reversa C₃₀ na análise de pimentas verde e vermelha devido à sua capacidade de separar um grande número de carotenóides.

Em grande parte dos trabalhos realizados, os carotenóides foram identificados por comparação do comportamento cromatográfico observado nas separações por CLAE e dos espectros de absorção no Uv-Vis com padrões comerciais e dados da literatura. Também foram realizadas derivatizações químicas para determinação dos grupos funcionais presentes nos carotenóides, com intuito de auxiliar na identificação (Cano & de Ancos, 1994; Cano *et al.*, 1996; Hamano & Mercadante, 2001; Assunção & Mercadante, 2003). Além disso, Oliveira *et al.* (2003) utilizou co-cromatografia com padrões comerciais para confirmar a identidade de β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina.

No entanto, a identificação de carotenóides tendo como base apenas o espectro de absorção e o tempo de retenção pode favorecer conclusões equivocadas, especialmente devido a falta de reprodutibilidade dos tempos de retenção. A utilização de co-cromatografia com padrões pode auxiliar na identificação, porém em certas ocasiões, carotenóides diferentes podem apresentar o mesmo tempo de retenção em um dado sistema cromatográfico, complicando ainda mais confirmação da identidade dos carotenóides. Assim como ocorre com carotenóides que possuem o mesmo cromóforo e conseqüentemente apresentam o mesmo espectro de absorção (Rodriguez-Amaya, 2001).

Por isso, inúmeros autores recomendam a associação das técnicas citadas acima à espectrometria de massas (MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmação da identidade da molécula, quando possível. Godoy & Rodriguez-Amaya (1990) obtiveram a confirmação da identidade de um monoepóxido de β -criptoxantina de mamão através do uso da EM.

Empregando a MS e a RMN, Mercadante *et al.* (1996) conseguiram elucidar a estrutura de um apocarotenóide presente em urucum (*Bixa orellana* L.) como 9'-*cis*-apo-6'-licopenato. Em continuação deste trabalho foram isolados e identificados outros cinco carotenóides de urucum (Mercadante *et al.*, 1997a).

Da mesma forma, os carotenóides *all-trans*- β -caroteno, *all-trans* e *cis* β -criptoxantina, *all-trans*-zeaxantina, isômeros de luteoxantina, *all-trans* e *cis* violaxantina; e *all-trans* e *cis* neoxantina foram isolados, identificados com o uso de MS e quantificados por CLAE em manga cultivar Keitt (Mercadante *et al.*, 1997). Posteriormente, Mercadante *et al.* (1998, 1999a) isolaram e identificaram conclusivamente 13 carotenóides de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* L) e 16 carotenóides de goiaba vermelha brasileira.

Em vários estudos os principais carotenóides foram quantificados por CLAE utilizando colunas de fase reversa C₁₈ e curva de calibração externa com padrões (Khachik & Beecher, 1988; Chen *et al.*, 1995 e 1996; Hamano & Mercadante, 2001; Silva & Mercadante, 2002a; Assunção & Mercadante, 2003), embora em alguns outros apenas os carotenos tenham sido quantificados (Rouseff *et al.*, 1992; Sant'Ana *et al.*, 1998).

3.3.2. Antocianinas

A CLAE também tem sido o método mais utilizado para separação de antocianinas em alimentos. Recentemente, Merken & Beecher (2000) publicaram uma revisão sobre preparação da amostra e separação por CLAE de flavonóides, incluindo os antociânicos, em alimentos.

Na maioria dos estudos realizados com frutas, tais como mirtilo (Wang *et al.*, 2000), lichia (Sarni-Manchado *et al.*, 2000) e amora vermelha (Ancos *et al.*, 2000), e com vegetais como batata vermelha (Lewis *et al.*, 1998) e cebola roxa (Donner *et al.*, 1997), as antocianinas foram separadas em colunas de fase reversa de C₁₈. Por outro lado, uma coluna de fase reversa de polímero PLRP-S

utilizada por Rodriguez-Saona *et al.* (1998), proporcionou melhor separação das antocianinas aciladas presentes em batata roxa, quando comparada à coluna C₁₈ (Giusti *et al.*, 1999).

Para eluição das antocianinas de cereja, Gao & Mazza (1995) empregaram um gradiente de metanol e ácido fórmico 5%, assim como Slimstad & Solheim (2002) na análise de antocianinas de black currant e Oliveira *et al.* (2001) de uva Seibel. Outros pesquisadores obtiveram melhores separações de antocianinas utilizando gradientes de acetonitrila associada à diferentes ácidos. O ácido fosfórico 4% foi utilizado por Hong & Wrolstad (1990) na análise de sucos de framboesa, mirtilo, morango e repolho roxo, e por Ancos *et al.* (2000) na análise de framboesas frescas. Enquanto que Einbond *et al.* (2004) empregaram ácido acético 10% na separação das antocianinas de acerola, manga, jabuticaba, pitanga, entre outras frutas. Observou-se também a utilização de ácido fórmico juntamente com a acetonitrila na eluição de antocianinas de uva de mesa sem semente (Gao & Cahoon, 1995).

Devido à dificuldade de obter padrões de antocianinas, em vários estudos, todas as antocianinas separadas foram quantificadas utilizando somente um único padrão. Gil *et al.* (2000) expressaram as quantidades de delphinidina-3-glucosídeo e cianidina-3-glucosídeo de suco de pomegranate como cianidina-3-glucosídeo. Assim como fizeram Sarni-Manchado *et al.* (2000) com a cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glucosídeo de lichia, e Gao & Mazza (1995) com as oito antocianinas de cereja.

Donner *et al.* (1997) também quantificaram as oito antocianinas de cebola roxa com padrão de cianidina-3-glucosídeo, e estas foram expressas como porcentagem de área. Outra alternativa foi medir a concentração do extrato total em espectrofotômetro e usar absorvidade da pelargonidina 3-glucosídeo (Rodriguez-Saona *et al.*, 1998) ou da malvidina 3-glucosídeo, expressando as oito antocianinas de uva como porcentagem de área deste total (Carreño *et al.*, 1997).

A escassez de padrões também contribuiu para tornar identificação das antocianinas ainda mais difícil. Por isso, nos últimos anos intensificou-se o uso de métodos analíticos mais sofisticados a fim de obter informações mais precisas sobre a identidade das antocianinas. Entre eles encontra-se a CLAE acoplada a um detector de espectrometria de massas (CLAE-MS).

O bombardeio rápido de elétrons (FAB-MS), associado à CLAE, se tornou uma técnica muito útil no estudo das estruturas das antocianinas no final da década de 80 (Harborne & Grayer, 1988; Strack & Wray, 1989). Foi utilizada por diversos autores (Bakker & Timberlake, 1997; Baublis *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1995) para determinação do peso molecular das. No entanto, não se mostrou muito eficiente na análise de antocianidinas.

A utilização da CLAE-MS interface íon-spray-APCI (ionização química à pressão atmosférica) permitiu a determinação da estrutura de pelo menos 20 antocianinas de uva (*Vitis vinifera* L.) com diminuição da degradação das mesmas durante a análise (Baldi *et al.*, 1995).

Contudo, a espectrometria de massa por ionização “electrospray” (ESI-MS) é considerada a técnica mais promissora na caracterização de antocianinas (Giusti *et al.*, 1999). A carga positiva das antocianinas em baixos valores de pH permite facilmente sua detecção a baixas voltagens, à medida que outros compostos interferentes não são ionizados. Após a separação por cromatografia líquida (LC), Giusti *et al.* (1999) avaliaram o uso da ESI-MS e da espectrometria de massas MS-MS (Tandem Mass Spectrometry) na elucidação de estruturas das antocianinas de batata roxa (pelargonidina-3-rutinosídeo, pelargonidina-3-rutinosídeo-5-glucosídeo acilada com ácidos p-cumárico e ferrúlico), rabanete (pelargonidina-3-soforosídeo-5-glucosídeo acilada com ácidos p-cumárico, ferúlico e malônico) entre outras amostras, e relataram que ambas as técnicas são ferramentas rápidas e efetivas na avaliação da identidade das antocianinas.

Revilla *et al.* (1999) encontraram grandes quantidades de cianidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo e petunidina-3-rutinosídeo em cascas de uvas (Cabernet Sauvignon) e em vinhos comerciais, e reportaram que a identificação destas antocianinas foi facilitada ao combinar as informações obtidas pelo DAD e pelo MS.

Wang *et al.* (2003) determinaram a composição de antocianinas de suco de diferentes uvas por CLAE/DAD/ESI-MS e relataram que o acoplamento do espectrômetro de massas íon trap ao cromatógrafo líquido proporcionou maior sensibilidade no monitoramento do íon molecular.

Apesar da associação de diversas técnicas, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ainda representa a mais poderosa ferramenta na elucidação estrutural de antocianinas. Andersen *et al.* (1991) foram os primeiros a aplicar esta técnica para caracterizar antocianinas. Giusti *et al.* (1998) utilizaram RMN de uma e duas dimensões para confirmação estrutural de quatro antocianinas de rabanete vermelho (*Raphanus sativus*), sendo duas monoaciladas e duas diaciladas (pelargonidina-3-glucosídeo esterificada com ácidos malônico, ferúlico e cumárico).

Após o isolamento das antocianinas de vinho do Porto por CLAE semi-preparativa, e posterior análise por ESI-MS, Mateus *et al.* (2002) empregaram RMN de próton e de carbono para a confirmação da estrutura da malvidina-3-glucosídeo e de seus derivados. Da mesma forma, Einbond *et al.* (2004) também associaram ESI-MS e RMN para confirmar a identidade das principais antocianinas de acerola (cianidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo), jabuticaba e cainito roxo (*Chrysophyllum cainito*) (cianidina-3-glucosídeo) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (delphinidina-3-glucosídeo).

Também partindo do mesmo princípio, Ando *et al.* (2000) utilizaram FAB-MS e RMN na análise das antocianinas majoritárias de petúnias vermelhas (cianidina-3-soforosídeo, cianidina-3-glucosídeo e peonidina-3-glucosídeo) e

Petunia exserta (delfinidina-3-glucosídeo, delfinidina-3-rutinosídeo e petunidina-3-rutinosídeo).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia*), procedentes de duas regiões distintas do estado de São Paulo, foram adquiridos na CEAGESP em São Paulo e transportados para Campinas, com o objetivo de estudar sua composição de carotenóides e antocianinas. A Figura 6 apresenta uma fotografia, tirada no laboratório, dos frutos de camu-camu adquiridos em Mirandópolis (amostra de 06/07/02). A procedência, quantidade e data de aquisição dos frutos de camu-camu para análise qualitativa e quantitativa estão apresentados na Tabela 5.

4.1.1. Caracterização

Os frutos de camu-camu das duas cidades foram pesados e medidos individualmente (entre 10 e 20 unidades). Os frutos de Mirandópolis apresentaram menor peso ($7,6 \pm 1,9$ g) em relação aos de Iguape ($8,7 \pm 2,1$ g), bem como menor diâmetro, $21,7 \pm 3,0$ mm contra $24,0 \pm 2,1$ mm.

O peso e a porcentagem de casca, polpa e caroço dos frutos também foram determinados. Os frutos de Iguape apresentaram peso total médio de $8,7 \pm 2,1$ g, sendo constituídos de $1,5 \pm 0,2$ g de casca, $1,6 \pm 0,5$ g de caroço, e $4,7 \pm 1,1$ g de polpa. Estas partes representaram, respectivamente, 19,5%, 20,4% e 60,1% do fruto. Enquanto que os frutos de Mirandópolis apresentaram peso total médio de $7,6 \pm 1,9$ g, contendo $1,4 \pm 0,2$ g de casca, $1,6 \pm 0,4$ g de caroço, e $4,5 \pm 0,9$ g de polpa, representando 19,2%, 21,5% e 59,3%, respectivamente.

Ao mesmo tempo, verificou-se os valores de °Brix e de pH dos frutos. A quantidade de sólidos solúveis (°Brix) da polpa, variou de 6,5 a 8,5 para frutos procedentes de Mirandópolis e de 6,0 a 6,5 para os de Iguape.



Figura 6. Fotografia, tirada no laboratório, dos frutos de camu-camu utilizados neste estudo.

Tabela 5. Procedência e data de compra das amostras.

Cidade	Tipo de análise	Peso aproximado (kg)	Data de aquisição
Mirandópolis	Qualitativa	6,0	06/07/02
Iguape	Qualitativa	4,0	07/04/03
Iguape	Qualitativa	2,0	05/05/03
Iguape	Teste	2,0	07/05/03
Iguape	Quantitativa	2,0	13/05/03
Iguape	Quantitativa	2,0	27/05/03
Iguape	Quantitativa	2,0	04/06/03
Mirandópolis	Teste	2,0	08/07/03
Mirandópolis	Quantitativa	2,0	12/07/03
Mirandópolis	Quantitativa	2,0	15/07/03
Mirandópolis	Quantitativa	2,0	17/07/03

O pH variou de 2,6 a 2,9 e de 2,4 a 2,8 para o camu-camu de Mirandópolis e Iguape, respectivamente. Sendo que as variações de pH e brix se devem provavelmente aos diferentes estádios de maturação das amostras adquiridas.

Também devido aos diferentes estádios de maturação dos frutos, o camu-camu procedente de ambas as cidades não apresentou uniformidade de cor. Este aspecto foi observado tanto entre os frutos de um mesmo lote, quanto nos frutos de lotes diferentes.

4.1.2. Amostragem e preparação

A amostragem foi feita aleatoriamente, em lotes de aproximadamente 2 Kg. Os frutos lavados foram descascados manualmente, sendo retiradas polpa e caroços que posteriormente foram descartados. As cascas foram trituradas em liquidificador.

Para análise qualitativa de carotenóides foram utilizados 150 g de casca *in natura* de camu-camu para preparação dos extratos, tanto para separação por cromatografia de fase normal, quanto para separação por cromatografia de fase reversa. Enquanto que para a análise quantitativa, o extrato foi preparado a partir de aproximadamente 12 g de cascas. Para o estudo do efeito da saponificação sobre a composição do extrato de carotenóides, foram utilizadas amostras de 20 g de cascas para cada experimento.

No caso das antocianinas, o extrato bruto utilizado para análise qualitativa foi preparado a partir de 100 g de cascas liofilizadas. Enquanto que para análise quantitativa foram utilizados de 10 a 25 g de casca *in natura*.

4.2. Solventes

Todos os solventes utilizados para separação por CLAE foram grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 µm. Todas as amostras foram

filtradas em membranas de polietileno, hidrofóbicas (Millex PTFE) para carotenóides, e hidrofílicas (Millex Durapore PVDF) para antocianinas, ambas com 0,22 µm de poro, imediatamente antes da injeção no cromatógrafo. Os solventes empregados nas separações em fase normal por cromatografia em coluna, em camada delgada e em papel foram grau PA, assim como os utilizados nas etapas de extração, saponificação e reações químicas.

4.3. Equipamentos

4.3.1. Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Os carotenóides e antocianinas foram analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters), injetor “Rheodyne” com alça de amostra (loop) de 20 µL, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line”, detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 650 nm e os cromatogramas processados em comprimento de onda fixo, sendo 450 nm para carotenóides, 520 nm para antocianinas e 280 nm para flavonóides não antociânicos.

4.3.2. Cromatógrafo líquido de alta eficiência para separação semi-preparativa

As antocianinas foram purificadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com uma única bomba para solvente (Knauer HPLC Pump 64) e injetor “Rheodyne” com alça de amostra (loop) de 500 µL acoplado a um detector UV-Visível (Knauer).

4.3.3. Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV/Visível e espectrômetro de massas (CLAE-UV/Vis-MS)

O equipamento utilizado para análise de antocianinas era constituído de um cromatógrafo líquido com sistema binário de solventes (HP, modelo G1328A), com injetor Rheodyne (20 µL), acoplado a um detector UV-Visível fixo (Merck, L 4000) e a um espectrômetro de massas (Bruker, Esquire). Foi utilizada ionização por elétron spray no modo positivo e o sistema de aquisição e processamento de dados foi HP Kayat XA, HP Chemstation, Esquire Control.

4.3.4. Cromatógrafo contra corrente de alta velocidade (HSCCC)

O extrato parcialmente purificado de antocianinas foi separado em um cromatógrafo modelo CCC-1000 de alta velocidade (Pharma-Tech Research Corp.) com bomba Biotronik (BT 3020, Jasco), equipado com três colunas preparativas, conectadas em série (tubos com diâmetro de 2,6 mm, volume total = 850 mL). A eluição foi monitorada a 520 nm por um detector UV-Visível (Knauer) e coletadas por um coletor de frações (Pharmacia LKB Super Frac) acoplado ao equipamento.

4.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN)

Todos os experimentos foram desenvolvidos em um espectrômetro Bruker AMX 300 (300 MHz).

4.4. Análise de carotenóides

Existem vários fatores que dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre o teor de carotenóides e antocianinas. Devido à estrutura desses compostos, a exposição ao oxigênio, luz e calor podem promover a degradação destes pigmentos, com conseqüente formação de artefatos. Cuidados como uso de solventes livres de peróxidos, ausência de luz, tempo total de análise o menor

possível, uso de atmosfera inerte, baixa temperatura e adição de antioxidante foram tomados. Para carotenóides evitou-se também o contato com ácidos.

4.4.1. Extração e saponificação

As etapas de extração e saponificação foram executadas de acordo com Mercadante *et al.* (1998). Para análise qualitativa, os carotenóides foram extraídos com acetona e hyflosupercel em almofariz. O extrato obtido foi filtrado em funil de Büchner, seguido de partição para éter etílico/éter de petróleo (1:1) em funil de separação. Para hidrolisar os ésteres de xantofilas, foi realizada a saponificação do extrato etéreo com igual volume de 10% KOH em metanol, à temperatura ambiente por uma noite. Posteriormente, foi feita a lavagem com água destilada para retirada do álcali, até pH neutro. Sulfato de sódio anidro foi adicionado com a finalidade de eliminar possíveis resíduos de água. Por fim, o extrato foi concentrado até *secura* em evaporador rotatório ($t < 35^{\circ}\text{C}$).

Após testes preliminares por cromatografia em camada delgada, observou-se que a saponificação dos lipídeos, nas amostras para análise qualitativa, havia sido incompleta. Portanto, foram avaliadas as melhores condições de retirada total dos lipídeos presentes do extrato de carotenóides. Foram testadas diferentes concentrações de KOH metanólico e diferentes proporções de extrato/álcali, as quais estão apresentadas na Tabela 6. Os experimentos foram submetidos a condições iguais de tempo (14 horas) e temperatura (ambiente).

Os extratos saponificados foram analisados por CLAE a fim de se observar a presença ou ausência dos ésteres de xantofilas. Estes compostos possuem tempo de retenção superior ao do β -caroteno e não apareceram nos cromatogramas dos extratos analisados, indicando que as reações de saponificação foram eficazes em todos os experimentos realizados. Porém, os experimentos 2, 3, 4, 6 e 8 apresentaram perda significativa na concentração de carotenóides totais, resultado da degradação dos mesmos por ação de altas concentrações de álcali.

Além disso, observou-se que a saponificação completa dos carotenóides dependia da proporção entre a quantidade de amostra extraída e o volume de solvente utilizado para partição dos carotenóides. Esta proporção foi estabelecida em 20 g de casca de camu-camu para 60 mL de éter etílico/éter de petróleo (1:1). Em seguida, o extrato etéreo de carotenóides foi saponificado utilizando igual volume de solução metanólica de 10% de KOH.

Para verificar se houve produção de artefatos até esta etapa, foi utilizada triagem de carotenóides por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica-gel (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1991) dos extratos bruto e saponificado.

Para as amostras analisadas quantitativamente, as extrações foram conduzidas em duplicata, sendo que os carotenóides foram extraídos, exaustivamente, com acetona e o extrato saponificado, conforme o procedimento descrito nos parágrafos anteriores.

Devido à presença de matéria branca (lipídeos insaponificáveis), o extrato seco foi dissolvido em acetato de etila grau cromatográfico para filtração quantitativa em membrana de polietileno de 0,22 µm de poro e novamente seco sob N₂. Imediatamente antes da injeção, este extrato foi redissolvido em acetato de etila/acetonitrila (85:15) e novamente filtrado em membrana de polietileno.

4.4.2. Separação semi-preparativa em fase normal.

4.4.2.1. Preparação das fases estacionárias

O óxido de alumínio neutro grau I (Merck) foi levado a grau III, de acordo com as especificações do fabricante, pela adição de água à alumina previamente submersa em éter de petróleo, seguida de agitação para completa incorporação da água. Uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro, com torneira, foi preenchida com esta suspensão, alcançando 10 cm de altura. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada na superfície para retirar possível resíduo de água presente no extrato.

Tabela 6. Condições avaliadas na saponificação dos carotenóides de camu-camu.

No. Experimento	Concentração de KOH	Proporção
	metanólico	extrato/álcali
1	20%	1:1
2	20%	1:3
3	30%	1:1
4	30%	1:3
5	15%	1:2
6	40%	1:2
7	25%	1:0,75
8	25%	1:4
9	25%	1:2
10	25%	1:2

As placas de sílica gel (Merck) e sílica-gel básica (preparada com 70g de sílica-gel e 150 mL de água destilada adicionada de uma pastilha de KOH à água incorporada à sílica) foram ativadas em estufa a 110°C por 2 horas. As placas de óxido de magnésio (MgO) foram preparadas utilizando quantidades iguais de MgO (Mallinckrodt) e terra diatomácea (Kieselguhr G – Merck) e foram ativadas por 1 hora à 110°C. Todas as placas cromatográficas preparadas no laboratório foram feitas com 0,5 mm de espessura. Foram utilizadas também placas prontas de sílica gel (Merck), com 0,25 mm de espessura.

A fase estacionária da coluna de MgO (Mallinckrodt)/Hyflosupercel (Celite Corporation) foi preparada na proporção de 1:2. Uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro foi preenchida a vácuo com o adsorvente até atingir 15 cm de altura, e uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada na superfície para reter resíduo de água remanescente na amostra.

4.4.2.2. Separação por cromatografia

A separação dos carotenóides foi realizada seguindo o procedimento descrito por Mercadante *et al.* (1998). Primeiramente, o extrato saponificado dissolvido em éter de petróleo foi submetido a uma cromatografia em coluna aberta de óxido de alumínio (grau III), gerando três frações. A fração F1, contendo os carotenos, foi separada utilizando 100% de éter de petróleo como fase móvel, já a segunda fração F2 constituída de monoidroxilados e epóxidos separou-se utilizando éter etílico/ éter de petróleo (70:30). Por fim, a fração 3 (F3) contendo xantofilas poliidroxiladas foi eluída com uma mistura de éter etílico/etanol (90:10). Todas as frações foram concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida ($t < 35^{\circ}\text{C}$), secas sob N_2 e armazenadas em freezer sob atmosfera de N_2 .

Posteriormente, a F1 foi dissolvida em éter de petróleo e aplicada em camada delgada de MgO, utilizando como fase móvel 100% de éter de petróleo para separar os interferentes lipídicos, que correram com a frente do solvente. Em seguida, a mesma placa foi desenvolvida com éter de petróleo/acetona (96:4), resultando em 7 bandas distintas (F1.1 - F1.7). Estas foram raspadas da placa

com auxílio de uma espátula, eluídas com éter de petróleo, e secas sob fluxo de N_2 .

As frações F2 e F3 foram primeiramente submetidas a uma coluna de MgO/hyflosupercel (1:2), previamente acondicionada em éter de petróleo, com intuito de retirar os lipídeos insaponificáveis, ou ainda resíduos de lipídeos saponificáveis que estavam interferindo nas separações por CCD. As frações foram dissolvidas em 50 mL de éter de petróleo e aplicadas na coluna. Foi utilizado 100% de éter de petróleo como fase móvel para retirar os interferentes incolores, sendo que os carotenóides da F2 foram eluídos da coluna com éter etílico/éter de petróleo (70:30) e a F3 com éter etílico/etanol (90:10). As mesmas foram novamente concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida ($T < 35^\circ C$) e secas sob fluxo de N_2 .

A F2 foi então separada em CCD de sílica gel básica, utilizando como fase móvel éter etílico/éter de petróleo (1:1), resultando em 3 bandas (F2.1, F2.2 e F2.3). As mesmas foram raspadas das placas, eluídas com éter etílico e submetidas à espectrofotometria no UV/Visível.

Os espectros de absorção destas bandas revelaram que todas as bandas eram compostas por misturas de carotenóides, com isso F2.1, F2.2 e F2.3 foram re-cromatografadas em camada delgada de MgO. Utilizando éter de petróleo/acetona (90:10) como fase móvel, 5 bandas foram separadas a partir da F2.1 (F2.1.1, F2.1.2, F2.1.3, F2.1.4 e F2.1.5) e 3 bandas a partir da F2.2 (F2.2.1, F2.2.2 e F2.2.3). Na separação da F2.3 utilizou-se como fase móvel éter de petróleo/acetona (80:20), gerando 6 novas bandas (F2.3.1, F2.3.2, F2.3.3, F2.3.4, F2.3.5 e F2.3.6), sendo que as duas últimas (F2.3.5 e F2.3.6) não foram raspadas da placa por estarem muito próximas e em baixa concentração. As bandas restantes foram novamente raspadas das placas, eluídas com éter etílico e secas sob fluxo de N_2 .

A F3 foi igualmente submetida à placa de sílica-gel básica, utilizando-se 100% de éter etílico como fase móvel, gerando 3 bandas distintas (F3.1, F3.2 e

F3.3), que foram retiradas das placas como descrito anteriormente. O espectro de absorção F3.1 mostrou que a mesma não estava pura. A seguir, a F3.1 foi re-cromatografada em placa de MgO, utilizando como fase móvel éter de petróleo/acetona (65:35). Como resultado da separação foram obtidas 3 novas bandas (F3.1.1, F3.1.2 e F3.1.3), as quais foram secas sob fluxo de N₂.

4.4.3. Separação por CLAE de fase reversa

A escolha e otimização do binômio coluna-fase móvel que permita a separação na linha base dos carotenóides é um dos pontos cruciais neste tipo de análise. Foram testadas colunas C₁₈ polimérica marca Vydac 218TP54 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) e monomérica marca Nova-Pak (4 µm, 300 mm x 3,9 mm) ambas com vazão de 1 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29 °C e uma coluna C₃₀ polimérica marca YMC (3 µm, 250 mm x 4,6 mm) também com vazão de 1 mL/min, porém a 33°C.

Em todos os testes de separação em coluna Vydac foi utilizada eluição isocrática, com 100% de metanol, metanol/acetonitrila (90:10), metanol/água (98:2), metanol/tetraidrofurano (THF) (98:2) ou metanol/água/THF (96:2:2). Contudo em nenhuma destas fases móveis foi obtida boa separação na linha de base dos carotenóides de camu-camu.

Para a coluna de fase reversa C₃₀ YCM, foi utilizado como fase móvel um gradiente constituído de água/metanol/éter *tert*-metil-butilítico (MTBE) descrito na Tabela 7 (Mouly *et al.*, 1999), o qual proporcionou excelente separação dos carotenóides e alguns de seus isômeros.

Várias combinações de solventes também foram testadas na separação de carotenóides em coluna de fase reversa C₁₈ Nova-Pak, utilizando diferentes proporções e gradientes. Primeiramente foi testada uma eluição isocrática de acetonitrila/metanol (85:15) (FM1). Em seguida, foi testado um gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila (FM2) partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção até 60 minutos.

Tabela 7. Gradiente utilizado como fase móvel na coluna de fase reversa C₃₀.

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	MTBE (%)
0	5	90	5
12	0	95	5
25	0	89	11
40	0	75	25
60	0	50	50

Com intuito de melhorar a separação de carotenóides polioidroxilados e também antecipar a eluição de carotenos, o gradiente descrito acima foi modificado para 88:10:2 atingindo 85:0:15 em 20 minutos, permanecendo nesta proporção até 50 minutos, e por fim atingindo 70:0:30 em 60 minutos de corrida (FM3). Para otimizar a separação de carotenos, foram testados ainda gradientes iguais às FM2 e FM3 porém trocando a acetonitrila por metanol. O resultado obtido indicou uma melhora na separação dos carotenos, entretanto, a separação de polioidroxilados foi extremamente prejudicada.

Na tentativa de associar a eficiência da acetonitrila na separação de polioidroxilados, e a do metanol na separação de carotenos, utilizou-se gradientes compostos de uma mistura de acetonitrila e água (90:10)/acetato de etila/metanol (FM6), partindo de uma proporção 98:2:0, atingindo 0:15:85 em 15 minutos e mantendo-se assim até 50 minutos. Como o resultado obtido não correspondeu às expectativas, foi feita a substituição do acetato de etila por THF (FM7) e por diclorometano (DCM) (FM8), utilizando o mesmo gradiente da FM6.

Foram realizados alguns testes para determinar o tempo de re-equilíbrio da coluna, que independentemente da fase móvel utilizada, ficou estabelecido como 12 minutos.

Para as análises quali e quantitativas dos carotenóides de camu-camu proveniente de Mirandópolis foi utilizada a coluna Nova-Pak e como fase móvel o gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila (FM2) descrito anteriormente. Já para os carotenóides de camu-camu procedentes de Iguape foi feito um ajuste no gradiente, devido à ausência ou baixa concentração de alguns carotenos. Sendo assim, o gradiente composto de acetonitrila/água/acetato de etila iniciou com proporção igual a 88:10:2, atingiu 85:0:15 em 15 minutos, e em seguida evoluiu para 70:0:30 em 35 minutos, mantendo-se assim até o final.

O extrato saponificado de carotenóides de camu-camu foi dissolvido na proporção inicial de cada fase móvel testada.

4.4.4. Análise qualitativa

4.4.4.1. Comportamento cromatográfico

A ordem de eluição dos carotenóides em fase reversa (CLAE), e em fase normal em CCD de sílica gel e MgO, foi relacionada com as características estruturais dos compostos e comparadas com dados da literatura. Além disso, foi realizada co-cromatografia com padrões para auxiliar na identificação dos carotenóides. Padrões de β -criptoxantina, apo-8'-carotenal, apo-10'-carotenal, apo-12'-carotenal, cedidos pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça), e de α -caroteno, obtido em laboratório, foram utilizados para co-cromatografia com o extrato total de camu-camu por CLAE, e por CCD em sílica, no caso da β -criptoxantina.

Os padrões de luteína, zeaxantina, rubixantina, γ -caroteno, 9-*cis*-licopeno e licopeno foram analisados, por CLAE, no sistema solvente estabelecido no item 4.4.3., para comparação dos tempos de retenção dos padrões com os carotenóides de camu-camu nas mesmas condições de análise.

4.4.4.2. Espectrofotometria UV/visível

Os espectros UV/vis. dos carotenóides isolados por cromatografia em fase normal foram comparados com dados da literatura (Davies, 1976; Britton, 1995). Além dos comprimentos de onda máximos de absorção, foi calculada também a estrutura fina dos espectros (%III/II). Para este cálculo foi traçada uma linha base no valor mínimo entre os picos III e II, e em relação a esta linha foi medida a altura do pico de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico de absorção do meio (II), o $\lambda_{\text{máx}}$ para a maioria dos carotenóides (Britton, 1995).

Quando pertinente, também foi calculado a intensidade do pico *cis* (% A_B/A_{II}), cálculo que é feito de forma semelhante ao de %III/II. A partir de uma linha base, foi medida a altura do pico *cis* (A_B), que é uma banda característica posicionada cerca de 142 nm abaixo do pico de comprimento de onda máximo, e

a altura do pico de absorção do meio (A_{II}), aquele com maior absorvância (Britton, 1995).

4.4.4.3. Derivatizações químicas

Algumas reações químicas específicas foram empregadas para determinação de alguns grupos funcionais e suas posições nos carotenóides isolados por fase normal.

Para verificar a presença de 1 ou 2 grupamentos epóxido nas posições 5,6- ou 5,6,5',6'-, foram adicionadas algumas gotas de HCl 0,1 N ao carotenóide dissolvido em etanol (Davies, 1976; Eugster, 1995). Tal procedimento leva a um rearranjo epóxi-furanóide, que é indicado pela diminuição de 20 nm no comprimento de onda máximo de absorção, para cada grupo epóxido (Davies, 1976; Eugster, 1995).

A fim de investigar a configuração geométrica da molécula, foi empregada a reação de isomerização catalisada por iodo e luz. Gotas de uma solução etérea de iodo foram adicionadas ao pigmento dissolvido neste mesmo solvente, seguido de exposição à luz por 3 min. Foram obtidos os espectros no UV/Visível antes e após a reação (Davies, 1976). Como resultado, o carotenóide *trans* sofre um deslocamento hipsocrômico, de 2 a 6 nm, enquanto que o isômero *cis* apresenta um aumento nos comprimentos de onda de absorção.

Para a confirmação da identidade de apocarotenóides foi realizada a reação de redução da carbonila à álcool primário, pela adição de cristais de boroidreto de sódio (NaBH_4) à solução etanólica do pigmento, armazenada por 3 horas em refrigerador. Foram registrados os espectros no UV/Visível antes e após a reação (Rodriguez-Amaya, 2001). Quando o resultado é positivo, o espectro do apocarotenóide, com banda única de absorção, converte-se em um espectro de três picos, com estrutura fina definida, típico de carotenóides. Além disso, ocorre um deslocamento hipsocrômico de aproximadamente 25 a 30 nm devido à perda de ligação dupla conjugada à extremidade da cadeia.

Para determinar se um grupamento hidroxila de uma xantofila é alílico à ligação dupla, foi empregada a reação de metilação catalisada por HCl. Após a adição de algumas gotas de HCl 0,2N ao carotenóide dissolvido em metanol, a reação foi desenvolvida por 3 horas no escuro (Rodriguez-Amaya, 2001). O produto e o pigmento original foram submetidos à CCD de sílica gel utilizando como fase móvel éter de petróleo/acetona (65:35). A reação positiva é indicada pela diminuição de polaridade do composto metilado.

4.4.5. Análise quantitativa

4.4.5.1. Padrões

Dentre os padrões utilizados para construção das curvas-padrão, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, rubixantina e γ -caroteno foram cedidos pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça). Já os padrões de carotenóides não disponíveis foram isolados de fontes naturais ricas no mesmo.

Para obtenção de α -caroteno e β -caroteno, os carotenóides foram extraídos de 170 g de cenoura com acetona, seguido de partição para éter de petróleo e saponificação com 10% KOH em metanol por 16 horas. Após a retirada do álcali, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório.

Os padrões foram separados e purificados segundo procedimento descrito por Assunção & Mercadante (2003), envolvendo sucessivas CCD de MgO. Por fim, α -caroteno e β -caroteno foram raspados das placas, eluídos com éter de petróleo e secos sob fluxo de N_2 .

Alternativamente, a purificação foi realizada através da técnica de cristalização. Inicialmente, α -caroteno e β -caroteno foram separados por cromatografia em coluna de MgO/hyflo-supercel, concentrados em evaporador rotatório e secos sob N_2 . Em seguida, foram solubilizados em pequena quantidade de éter de petróleo e metanol foi adicionado lentamente. A solução contendo os cristais foi armazenada a -18°C por uma noite. Posteriormente, a mesma foi

centrifugada (4000 rpm/min por 4 min) e a fração líquida retirada com pipeta Pasteur. Os cristais foram lavados sucessivas vezes com metanol gelado, novamente centrifugados e em seguida secos sob N₂ por 2 horas. A fim de obter cristais com maior teor de pureza, foi repetido o procedimento de cristalização.

Todos os padrões foram analisados por CLAE em coluna de C₁₈ (Nova-Pak) utilizando como fase móvel gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila (FM2) a 1 mL/min e 29°C. A pureza dos padrões sintéticos utilizados na realização de co-cromatografias e curvas-padrão está relacionada na Tabela 8.

4.4.5.2. Curvas-padrão

A concentração de cada padrão de carotenóide foi determinada a partir da absorvância máxima, aplicando-se a Lei de Beer, e utilizando as absorvidades ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) apresentadas por Davies (1976). A Tabela 9 mostra os solventes em que os carotenóides foram dissolvidos e os coeficientes de absorvidade usados para o cálculo das concentrações. As curvas de calibração foram construídas com sete concentrações diferentes, em duplicata, para cada pigmento padrão.

A concentração dos carotenóides de camu-camu foi calculada utilizando a relação área e concentração obtida para os padrões. Soluções contendo os pontos centrais das curvas-padrão foram injetados nos mesmos dias em que as amostras foram quantificadas, submetendo-os, conseqüentemente, às mesmas condições de análise por CLAE.

4.5. ANÁLISE DE ANTOCIANINAS

4.5.1. Extração qualitativa

As antocianinas do camu-camu foram extraídas com uma solução metanólica de HCl 0,5% por 16 horas a 5 °C em ausência de luz. A solução foi filtrada a vácuo em funil de vidro sinterizado n° 2, e o resíduo foi novamente submetido à extração.

Tabela 8. Porcentagem de pureza encontrada para os padrões de carotenóides cedidos pela DSM Nutritional Products.

Carotenóide	Porcentagem de Pureza (%)
luteína	95,8
zeaxantina	99,0
β -criptoxantina	99,6
rubixantina	96,4
γ -caroteno	99,0
licopeno	98,1
β -apo-8'carotenal	98,0
β -apo-10'carotenal	95,0
β -apo-12'carotenal	80,0

Tabela 9. Solventes e absortividades utilizados para o cálculo de concentração de padrões de carotenóides.

Carotenóide	Solvente	$A^{1\%}_{1cm}$
β -caroteno	éter de petróleo	2592
α -caroteno	éter de petróleo	2800
γ -caroteno	éter de petróleo	3100
β -criptoxantina	éter de petróleo	2386
rubixantina	acetona	2909
luteína	etanol	2550
zeaxantina	etanol	2540

Fonte: Davies (1976).

Em seguida, os filtrados foram combinados e concentrados à pressão reduzida (temperatura < 38°C) em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato bruto (Francis, 1982).

4.5.2. Antocianinas totais

A extração de antocianinas de casca de camu-camu foi feita em duplicata, com uma solução de etanol 95% e HCl 1,5N (85:15) em erlenmeyer (Francis, 1982). O extrato foi filtrado a vácuo em funil de vidro sinterizado nº 2, e o resíduo lavado com etanol acidificado até extração completa dos pigmentos. A solução resultante foi elevada a um volume de 1000 mL em balão volumétrico e a absorvância máxima desta solução diluída foi medida no $\lambda_{\max}$ da região do visível. A concentração total da solução foi calculada utilizando o valor de $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 982$. Este coeficiente é referente a absortividade da mistura de antocianinas de cranberries, e foi escolhido por possuir como antocianina majoritária cianidina-3-glucosídeo (Fuleki & Francis, 1968a; Zapsalis & Francis, 1965).

A composição relativa das antocianinas foi obtida através das áreas dos picos separados por CLAE, conforme condições descritas no item 4.5.4.

4.5.3. Separação e purificação das antocianinas

4.5.3.1. Cromatografia semi-preparativa em papel

Com o intuito de retirar flavonóides não antociânicos e açúcares, o extrato bruto foi aplicado em papel cromatográfico nacional, com eluição descendente utilizando HCl 1% como fase móvel. Após desenvolver por aproximadamente 18 horas, o papel foi seco à temperatura ambiente em capela. Por não terem sido eficientemente separadas, as 2 bandas resultantes do processo cromatográfico foram recortadas juntas, eluídas com metanol e concentradas a vácuo (temperatura < 38°C) em evaporador rotatório, obtendo-se um extrato parcialmente purificado.

Este extrato foi recromatografado em papel Whatman Chr 3 mm utilizando BFW (1-butanol/ácido fórmico/água (20:5:12)) como sistema de solvente) por 20 horas. As 4 zonas obtidas (Z1, Z2, Z3 e Z4) foram recortadas do papel já seco, eluídas separadamente com metanol e concentradas.

A fim de verificar se a retirada de açúcares livres foi eficiente durante os processos de purificação das antocianinas, foi realizada uma cromatografia em papel Whatman Chr 1 mm. Os extratos obtidos antes e após as técnicas de purificação foram cromatografados utilizando BEW (butanol/etanol/água (4:1:2,2)) como fase móvel e a revelação dos açúcares foi feita, após a secagem do papel à temperatura ambiente, pela aspersão de uma solução etanólica de ftalato de p-anisidina 0,1M seguida de aquecimento em estufa a 105°C por 2 a 3 min (Markham, 1982).

4.5.3.2. Cromatografia semi-preparativa em coluna

Na tentativa de encontrar um método mais rápido e eficiente para retirar interferentes a partir de grandes quantidades de extrato bruto, foi empregada uma coluna aberta utilizando um trocador catiônico como adsorvente. Esta foi preparada com 200 g de resina Amberlite XAD-7 (Sigma) acondicionada em água destilada. O preenchimento da coluna foi feito com o adsorvente em suspensão aquosa.

O extrato bruto foi dissolvido em 50 mL de água destilada e adicionado de 5 mL de ácido fórmico 10%. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com acetato de etila em funil de separação, para retirada de lipídeos e outros interferentes lipossolúveis (Degenhardt *et al.*, 2000).

A coluna foi previamente tratada com uma solução de ácido fórmico 2% (pH=2) e o extrato aplicado lentamente. A coluna foi então lavada com 1 L de água destilada e as antocianinas foram eluídas com uma mistura de metanol/ácido acético (19:1) e concentradas em evaporador rotatório ($t < 38^{\circ}\text{C}$), conforme

procedimento descrito por Degenhardt *et al.* (2000). A coluna foi regenerada após sucessivas lavagens com metanol acidificado, seguido de água destilada.

4.5.3.3. Purificação semi-preparativa por cromatografia contra-corrente de alta velocidade (HSCCC)

O extrato parcialmente purificado em coluna de XAD-7 foi previamente liofilizado para a separação por HSCCC. Para injeção, foram utilizados 500 mg de extrato dissolvidos em água/acetonitrila/ácido fórmico (87:3:10) (v:v:v), e a separação foi desenvolvida a 890 rpm. A fase móvel empregada na separação foi (TBME)/*n*-butanol/acetonitrila/água (2:2:1:5) + 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), com vazão de 3,5 mL/min. Foram separadas cinco frações e a eluição das mesmas foi monitorada a 520 nm por um detector UV/vis. Esta análise foi realizada pelo grupo do professor Peter Winterhalter, em Braunschweig – Alemanha.

4.5.3.4. Separação por CLAE-DAD

Foram realizados vários testes para determinar a escolha do binômio coluna-fase móvel mais eficiente na separação das antocianinas do camu-camu. Todos os experimentos foram desenvolvidos em coluna de fase reversa C₁₈ Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm), sempre com vazão de 1 mL/min a 25°C. À princípio, foi empregado um gradiente de ácido fórmico 5%/metanol (FM1) partindo de uma concentração inicial de 85:15 e atingindo 20:80 em 25 minutos (García-Vigueira *et al.* 1997). Em seguida, foi testada a substituição do metanol por acetonitrila (FM2), utilizando o mesmo gradiente, porém os resultados também não foram satisfatórios.

Em virtude disso, foi testado o uso do ácido fosfórico 4% associado ao metanol (FM3), entretanto, os resultados obtidos não corresponderam às expectativas. Por fim, a separação das antocianinas foi otimizada utilizando como fase móvel um gradiente ácido fosfórico 4%/acetonitrila (FM4) partindo de uma

concentração inicial de 85:15 e atingindo 20:80 em 25 minutos. O extrato bruto foi dissolvido em ácido fosfórico 4%/acetonitrila (85:15) imediatamente antes da injeção.

4.5.3.5. Separação por CLAE-UV-Visível-EM

A separação das antocianinas de camu-camu foi desenvolvida em uma coluna RP-12 Synergi MaxRO (250 x 4,6 mm) (Phenomenex, Alemanha), e a amostra foi solubilizada em água/acetonitrila/ácido fórmico (87:3:10) (v:v:v). Como fase móvel foram empregados dois sistemas solventes diferentes: o sistema A constituído de solvente A (água/acetonitrila/ácido fórmico - 87:3:10 v:v:v) e solvente B (água/acetonitrila/ácido fórmico – 40:50:10 – v:v:v), com vazão de 0,5 mL/min; e o sistema B constituído de solvente A (2% de ácido acético) e solvente B (água/acetonitrila– 20:80- v:v), com vazão de 0,35 mL/min. Os gradientes de ambos sistemas estão apresentados na Tabela 10. Esta análise foi realizada pelo grupo do professor Peter Winterhalter, em Braunschweig – Alemanha.

4.5.3.6. Separação por CLAE semi-preparativa

Com finalidade de atingir porcentagem de pureza mínima para análise por RMN, as frações F4 e F5, obtidas por HSCCC, foram purificadas por CLAE semi-preparativa. As condições cromatográficas utilizadas para a purificação das antocianinas são as mesmas descritas no item anterior (4.5.3.5.). Esta análise também foi realizada pelo grupo do professor Peter Winterhalter, em Braunschweig – Alemanha.

4.5.4. Identificação

4.5.4.1. Comportamento cromatográfico

A identificação das principais antocianinas foi baseada em diversas etapas, dentre elas a cromatográfica, na qual foi possível observar a ordem de eluição das antocianinas nas fases reversa (CLAE) e normal (cromatografia em papel), nos diferentes sistemas solventes.

Tabela 10. Gradientes das fases móveis utilizadas na análise por CLAE-UV/Vis-MS.

Tempo (min) - Sistema A	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	94	6
20	80	20
35	60	40
40	40	60
45	10	90
55	94	6
Tempo (min) - Sistema B		
0	90	10
30	65	35
35	25	75
45	90	10

4.5.4.2. Espectro no UV/Visível

Os espectros de absorção do extrato bruto e da antocianina majoritária (Z2), isolada por cromatografia em papel, foram medidos em solução de HCl 1% em metanol, em espectrofotômetro entre 350 e 700 nm. Foi avaliado também, o perfil dos espectros de absorção obtidos pelo detector de arranjo de diodos entre 180 e 900 nm por CLAE, onde foi observado se houve absorvância em aproximadamente 310-320 nm que é um indicativo da presença de ácidos cinâmicos na molécula. Para ambos foi calculado o valor da relação da absorvância a 440 nm e no λ_{max} na região do visível que indica a presença ou não de açúcares no carbono 5 do íon flavilium (Francis, 1982).

A presença do açúcar na posição 5 também pode ser verificada pela existência de um ombro em torno de 440 nm no espectro de absorção (Wrolstad *et al.*, 2001).

4.5.4.3. Espectro de massas

Os espectros de massa foram analisados e após a identificação do íon molecular e fragmentos, principalmente o íon referente a aglicona, os resultados foram comparados com dados da literatura (Baldi *et al.*, 1995; Revilla *et al.*; 1999; Degenhardt *et al.*, 2000) Esta análise foi realizada pelo grupo do professor Peter Winterhalter, em Braunschweig – Alemanha.

4.5.4.4. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (^1H RMN)

Todos os espectros foram obtidos em $\text{CD}_3\text{OD} + \text{TFA}$ e as atribuições foram feitas com base nos dados publicados por Kim *et al.* (1989), van Calsteren *et al.* (1991) e Pedersen *et al.* (1993) Esta análise foi realizada pelo grupo do professor Peter Winterhalter, em Braunschweig – Alemanha.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de padrões

O extrato de cenoura, cujo cromatograma está apresentado na Figura 7, foi utilizado para obtenção de cristais de α -caroteno e β -caroteno através de metodologia aperfeiçoada no laboratório. Após a primeira cristalização a porcentagem de pureza, verificada por CLAE, foi de 80% para o β -caroteno e 92% para o α -caroteno. Efetuada a re-cristalização, o β -caroteno atingiu 98% e o α -caroteno 99% de pureza (Figuras 8 e 9), valores superiores aos encontrados nos padrões sintéticos doados pela DSM Nutritional Products e aos obtidos após sucessivas purificações em placas de MgO/kieselguhr (91% de pureza tanto para α -caroteno quanto para o β -caroteno).

O método desenvolvido foi eficiente para obtenção de cristais de alta pureza de α -caroteno e β -caroteno, além de justificar o uso de cenoura como boa fonte para obtenção de padrões de α -caroteno e β -caroteno.

5.2. Composição de carotenóides de camu-camu

Foram isolados 26 carotenóides por CCD, dos quais 18 foram tentativamente identificados, 4 foram misturas e 3 estavam em quantidade insuficiente para análise. A CLAE permitiu a separação de 32 carotenóides em coluna de fase reversa C_{18} , sendo que destes, 30 tiveram sua identidade confirmada, 2 não foram identificados e 1 não foi eficientemente separado. Enquanto que, em coluna de fase reversa C_{30} a separação do extrato bruto resultou em 40 carotenóides, sendo 26 identificados, 2 não identificados e 12 misturas.

Os frutos de camu-camu de ambas as regiões apresentaram perfis de carotenóides semelhantes. Porém, nos frutos do lote de 06/07/02, provenientes de Mirandópolis, observou-se um número maior de carotenóides minoritários.

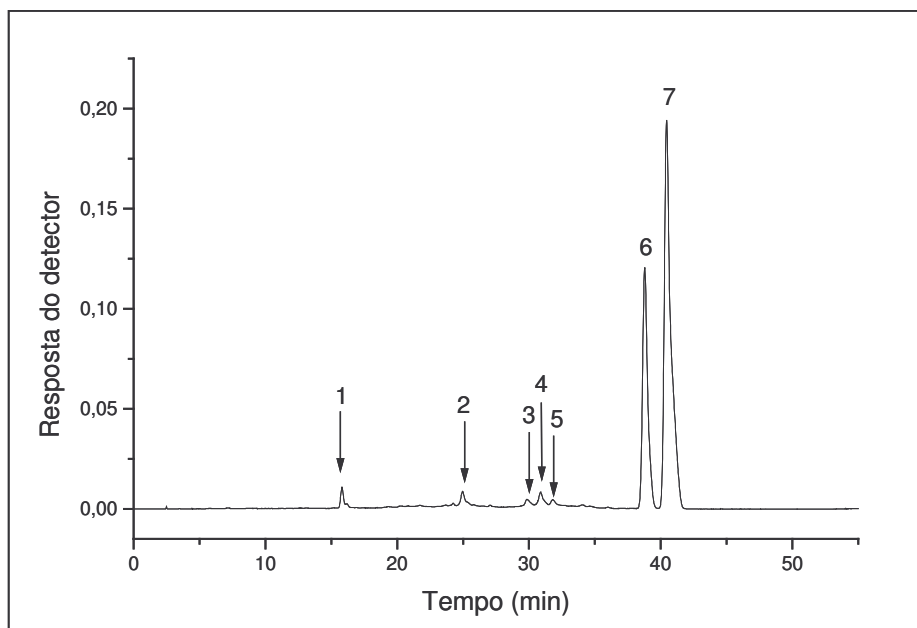


Figura 7. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto saponificado de cenoura. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 µm, 300 mm x 3,9 mm); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção o fim, vazão de 1 mL/min e 29 °C. Identidade dos picos: Pico 1: luteína, Pico 2: β-criptoxantina, Pico 3: neurosporeno, Pico 4: 5,8-epóxi-β-caroteno, Pico 5: mistura, Pico 6: α-caroteno e Pico 7: all-*trans*-β-caroteno.

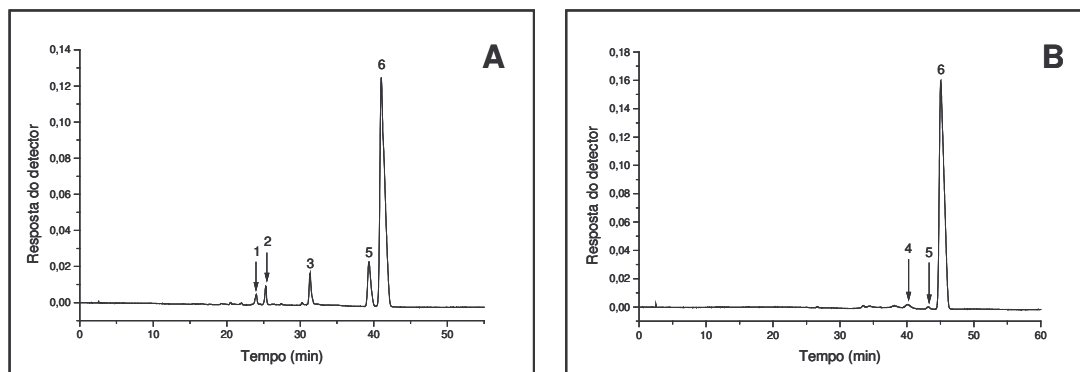


Figura 8. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos cristais de β -caroteno após a primeira cristalização (A) e após re-cristalização (B). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} monomérica Nova-Pak ($4\ \mu\text{m}$, $300\ \text{mm} \times 3,9\ \text{mm}$); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção até 50 minutos, vazão de 1 mL/min e $29\ ^\circ\text{C}$. Identidade dos picos: Pico 1: não identificado (447, 475 nm), Pico 2: β -criptoxantina, Pico 3: 5,8-epóxi- β -caroteno, Pico 4: 5,6-epóxi- β -caroteno, Pico 5: 9-*cis*- β -caroteno e Pico 6: all-*trans*- β -caroteno.

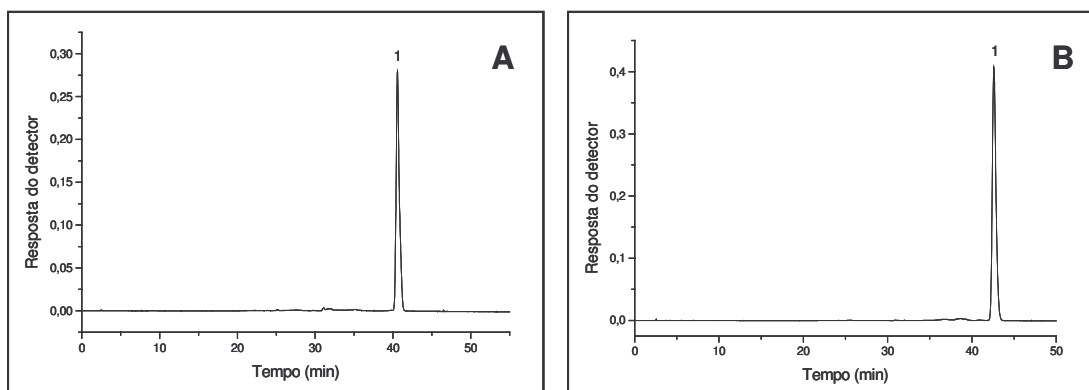


Figura 9. Cromatogramas, obtido por CLAE, dos cristais de α -caroteno após a primeira cristalização (A) e após re-cristalização (B). Condições cromatográficas: idem à Figura 8. Identidade do pico: Pico 1: all-*trans*- α -caroteno.

5.2.1. Composição qualitativa

5.2.1.1. Separação por fase normal

Considerando que a ordem de eluição dos carotenóides está relacionada com a sua estrutura, as Figuras 10, 11 e 12 apresentam as estruturas dos carotenóides identificados em frutos de camu-camu.

Ao submeter o extrato de carotenóides de camu-camu à cromatografia de coluna aberta, utilizando como fase estacionária o óxido de alumínio (grau III) que é um adsorvente de fase normal, foi possível observar a eluição de três frações. Primeiramente, eluiu a fração F1 contendo os carotenos, que quimicamente são hidrocarbonetos, em seguida, a fração F2 composta de carotenóides com uma função oxigenada (grupo hidroxila e/ou epóxido), e por fim, a fração F3 constituída de xantofilas com 2 ou 3 grupos hidroxilas e/ou epóxidos.

Para a separação dos carotenos (F1) por fase normal foi empregada a cromatografia em camada delgada de MgO (Figura 13), que apresenta grande afinidade por ligações duplas conjugadas, sendo a polaridade um fator menos decisivo. Sendo assim, um número maior de ligações duplas conjugadas (l.d.c) implica em maior adsorção (Mercadante, 1999b).

Porém, a localização desta ligação dupla também é relevante, pois quando a mesma está localizada no grupo terminal cíclico, na forma de anel β , esta apresenta um impedimento estérico que dificulta as interações com os sítios ativos do adsorvente quando comparada a uma estrutura totalmente acíclica. Este fato pode ser observado no esquema da Figura 13, onde carotenos com onze l.d.c. apresentaram fatores de retenção (R_f) distintos. O licopeno (F1.7), que possui estrutura acíclica, apresentou menor deslocamento em relação ao γ -caroteno (F1.6), que apresenta um anel β em uma das extremidades da cadeia e um grupo acíclico em outra. Este último, por sua vez, ficou mais retido que o β -caroteno (F1.2) que contém anéis β nas duas extremidades da cadeia (Figura 10), o que diminui sua retenção (Figura 13 e Tabela 11).

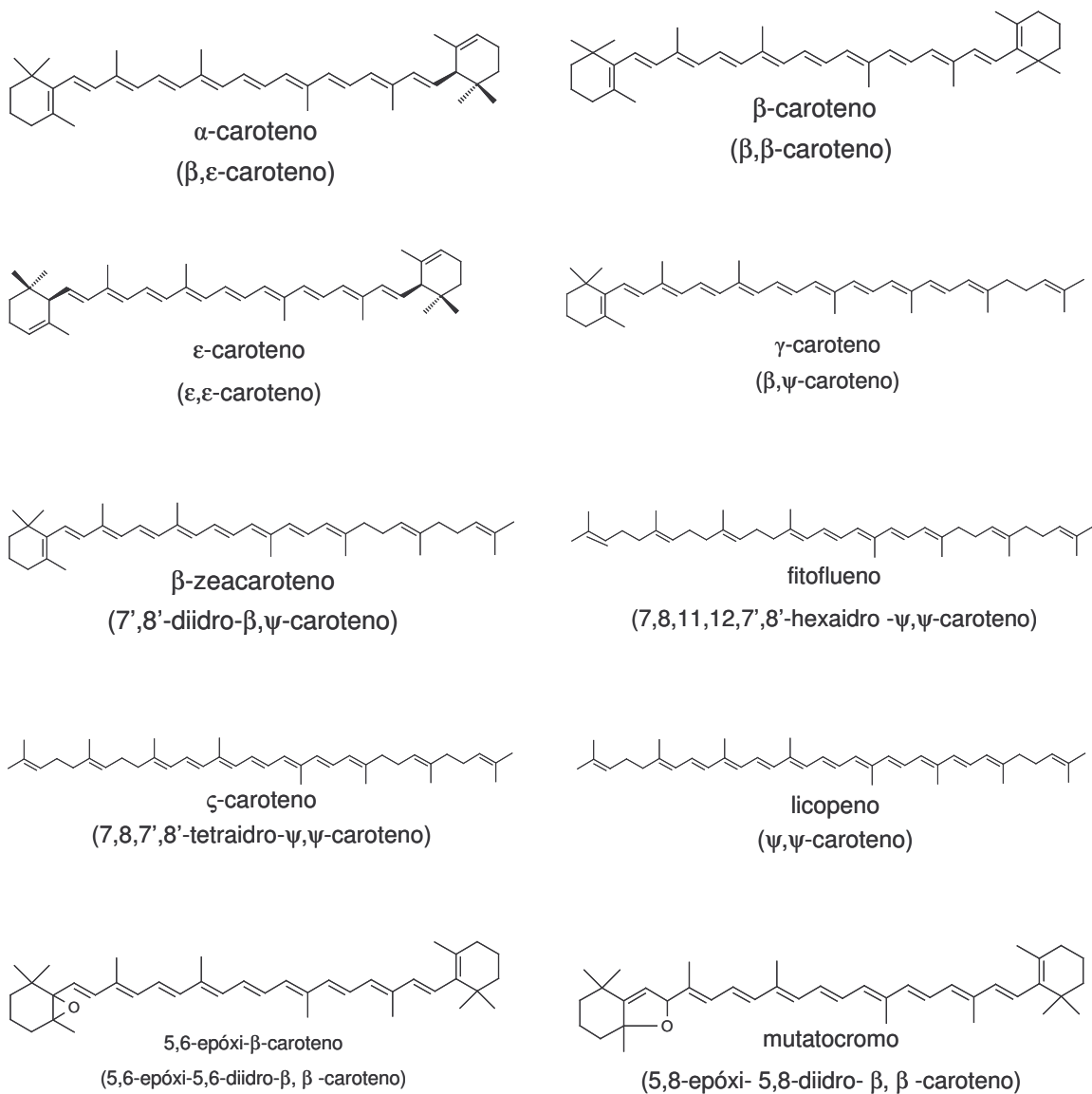


Figura 10. Estruturas dos carotenos e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu-camu.

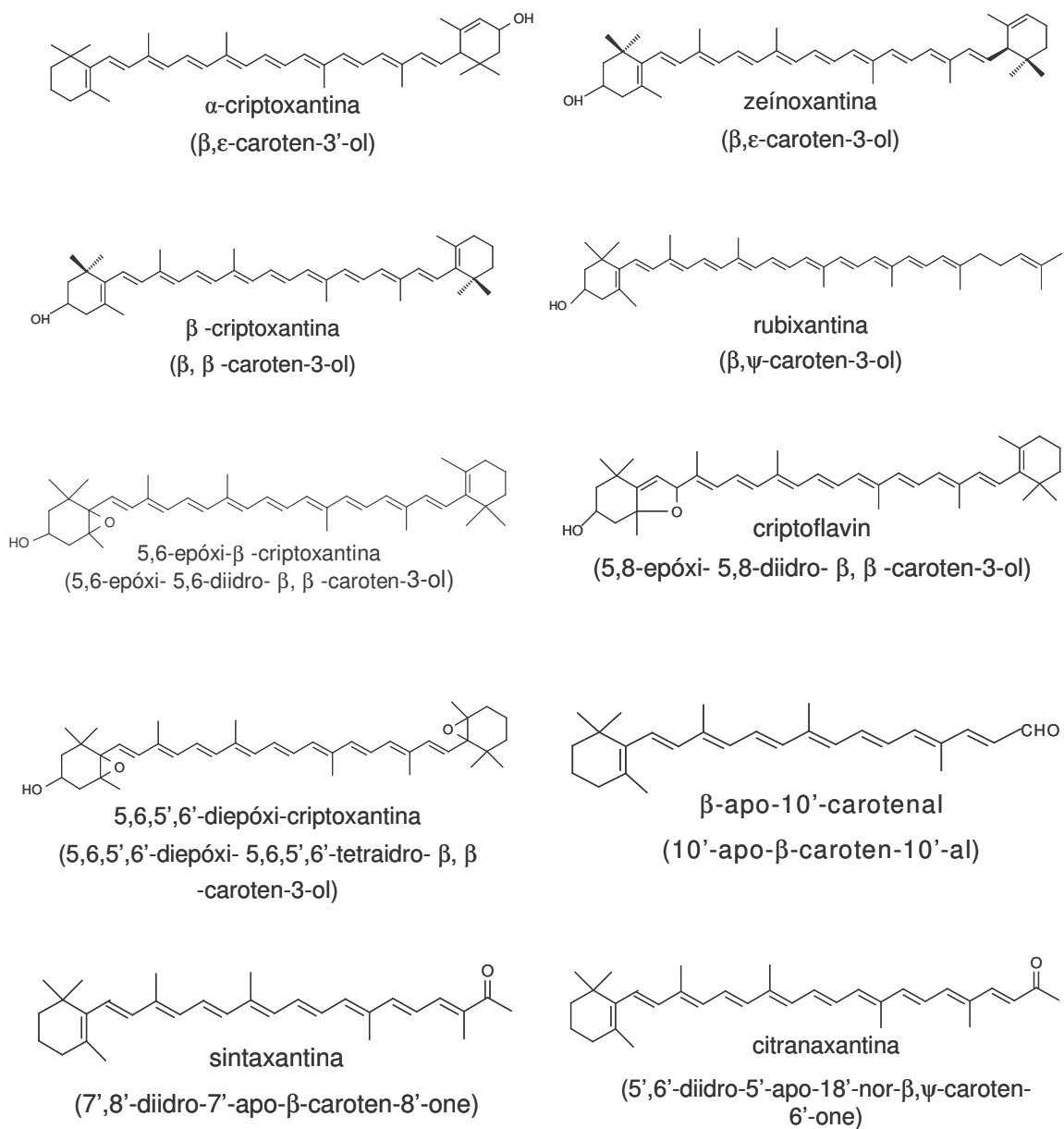


Figura 11. Estrutura dos apocarotenóides, carotenóides monoidroxilados e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu-camu.

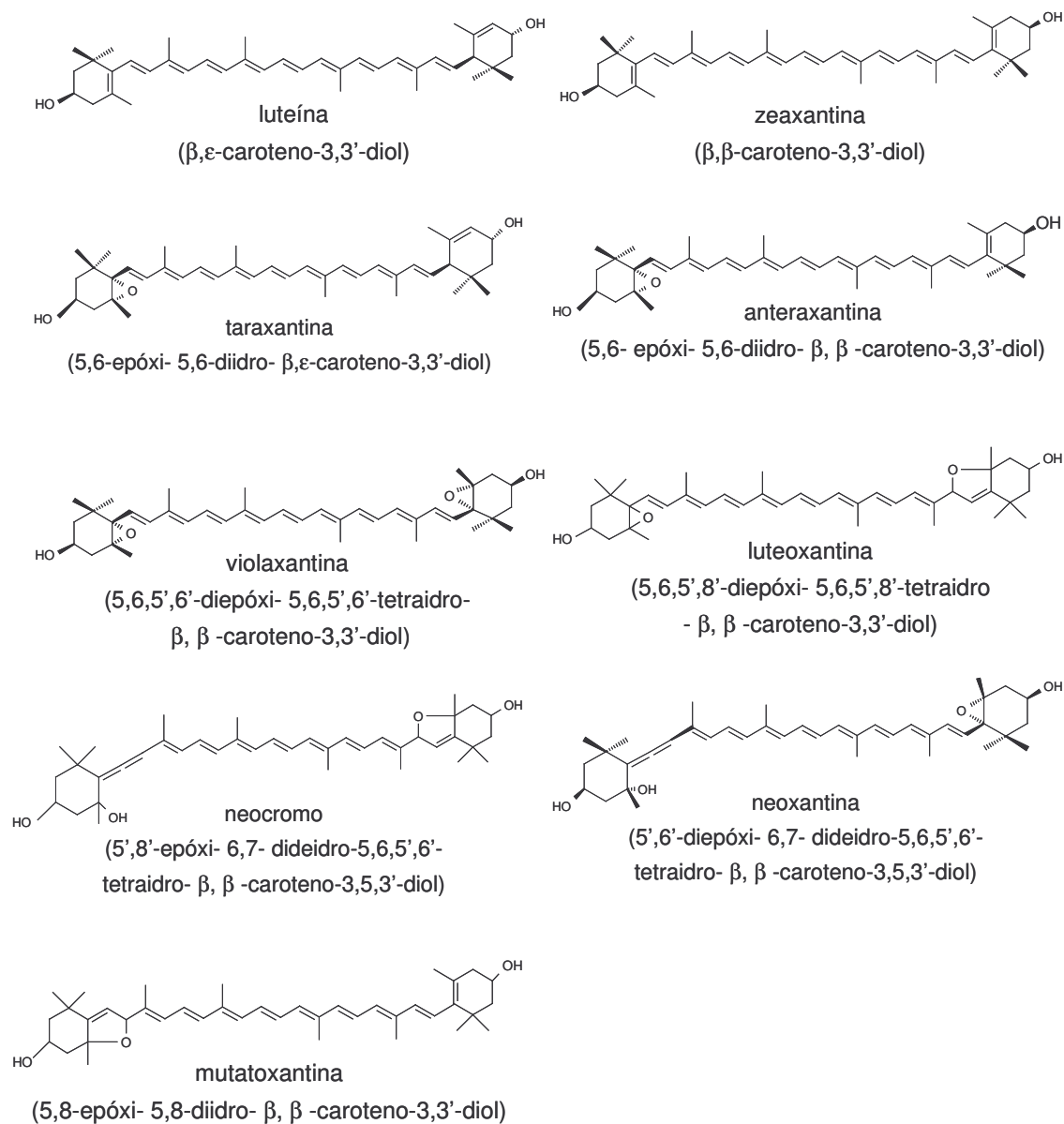


Figura 12. Estrutura dos carotenóides poliidroxilados e seus respectivos epóxidos encontrados em frutos de camu-camu.

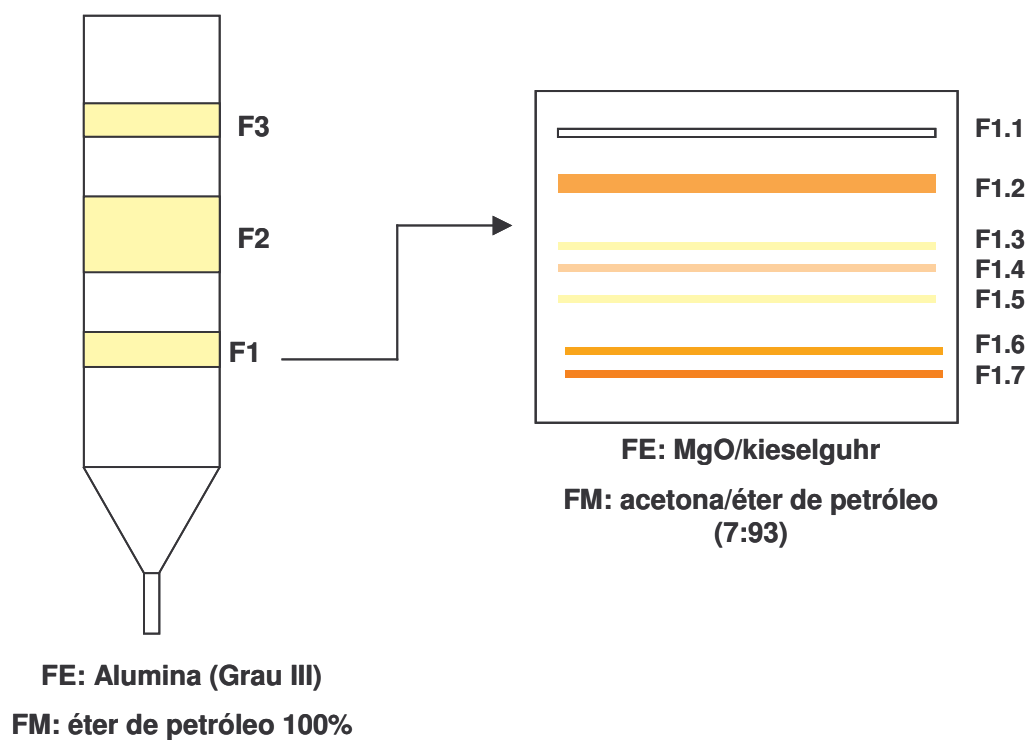


Figura 13. Esquema da separação dos carotenos de camu-camu. A identidade das frações pode ser verificada na Tabela 11.

Tabela 11. Características dos carotenóides de camu-camu separados por CCD.

Fração	Carotenóide	Rf	$\lambda_{\max}$ (nm)	%III/II	Observações
F1.1	fitoflueno	1,0**	329, 346, 366 ^a	86%	
F1.2	β -caroteno	0,78**	422, 446, 474 ^a	28%	
F1.3	ζ -caroteno	0,68**	376, 398, 422 ^a	104%	
F1.4	β -zeacaroteno	0,59**	403, 427, 452 ^a	25%	
F1.5	mistura	0,47**	414, 434, 456 ^a	38%	
F1.6	γ -caroteno ^d	0,15**	442, 464, 489 ^a	nc	
F1.7	licopeno	0,05**	442, 468, 498 ^a	48%	
F2.1.1	β -apo- 10'carotenal	0,96**	422, 448, 474 ^b 420, 446, 472 ^c	0 11%	
F2.1.2	5,6-epóxi- β - caroteno	0,57**	423, 440, 471 ^a	25%	
F2.1.3	mistura	0,24**	444 ^a 444 ^b	0 0	Reação redução (-)
F2.1.4	sintaxantina	0,09**	431, 455, 482 ^a 434, 458, 486 ^b	13% 3%	Reação Epóxido (-)
F2.1.5	traços	0,04**			
F2.2.1	β -criptoxantina	0,74**	422, 446, 472 ^a 422, 448, 470 ^b 424, 448, 472 ^c	29% 8% 27%	Co-cromatografia (+) Reação Isomerização (+) Reação Epóxido (-)
F2.2.2	mistura	0,49**	434, 452 ^c	120%	
F2.2.3	rubixantina	0,17**	434, 460, 488 ^b 434, 458, 486 ^c	50% 50%	Reação Epóxido (-)
F2.3.1	5,6,5',6'-diepóxi- β -caroteno	0,55**	410, 438, 468 ^c	64%	
F2.3.2	5,6-epóxi- β - criptoxantina	0,47**	420, 443, 473 ^c	50%	
F2.3.3	não identificado	0,41**	406 ^c	0	
F2.3.4	mistura	0,30**	398, 419, 444 ^c	122%	
F2.3.5	traços	0,19**	398, 423, 442 ^c	-	
F2.3.6	traços	0,02**	-	-	

F3.1.1	all- <i>trans</i> -luteína	0,74**	416, 440, 468 ^a	56%	Reação Isomerização (+)
F3.1.2	zeaxantina	0,36**	422, 446, 474 ^a	18%	
F3.1.3	mutatoxantina	0,17**	400, 424, 448 ^a	40%	Reação Epóxido (-)
					Reação de metilação (-)
F3.2	violaxantina	0,48*	416, 438, 466 ^a	42%	Reação Epóxido (+)
			418, 440, 468 ^b	31%	
F3.3	neoxantina	0,33*	412, 434, 436 ^a	38%	Reação Epóxido (+)
			418, 438, 464 ^b	35%	

^a Solvente: éter de petróleo, ^b solvente: etanol, ^c solvente: éter etílico.

^d não puro.

*Placa cromatográfica de sílica gel, ** Placa cromatográfica de MgO/Kieselguhr

nc: não calculado devido à presença de impureza na região.

Nas separações por cromatografia em camada delgada de sílica gel, que também é um adsorvente de fase normal, foi observado um menor deslocamento dos compostos mais polares (Figuras 14 e 15, Tabela 11), resultado da interação dos grupamentos hidroxila das xantofilas e/ou epóxido com os grupos silanóis da sílica, provavelmente através de interações de ponte de hidrogênio.

Este comportamento foi observado na separação dos carotenóides monoidroxilados (F2) por CCD de sílica gel (Figura 14). As xantofilas com um grupo epóxido em sua estrutura, como a 5,6-epóxi- β -criptoxantina (F2.3.2) apresentaram maior retenção em relação a carotenóides como a β -criptoxantina (F2.2.1) com apenas um grupo hidroxílico. Entretanto, a sílica não proporcionou a separação de xantofilas de polaridade semelhante, como a β -criptoxantina (F2.2.1) e a rubixantina (F2.2.3) (estruturas na Figura 11). Conforme mecanismo explicado anteriormente, as mesmas foram facilmente separadas por CCD de MgO, levando em consideração que rubixantina possui apenas um grupo terminal cíclico na cadeia.

Apesar da F2 ter sido a maior fração dentre as obtidas por cromatografia em coluna de óxido de alumínio, apenas poucos carotenóides presentes na mesma foram tentativamente identificados. Isso ocorreu devido ao grande número de bandas resultantes da separação da F2 por CCD de sílica gel e MgO e algumas frações não foram eficientemente separadas como foi o caso das F2.1.3, F2.2.2 e F2.3.4. Além disso, muitas outras como as F2.1.5, F2.3.5 e F2.3.6 se encontravam em baixa concentração, não permitindo posterior análise química e espectrofotométrica, o que impossibilitou sua identificação.

Como esperado, carotenóides como a violaxantina (F3.2) com duas hidroxilas e dois grupos epóxidos presentes na molécula, e a neoxantina (F3.3) com três hidroxilas e um grupo epóxido, ficaram mais fortemente adsorvidos que xantofilas como a luteína (F3.1.1) e zeaxantina (F3.1.2) (Figura 15) que contém apenas duas hidroxilas cada (as estruturas estão apresentadas na Figura 12).

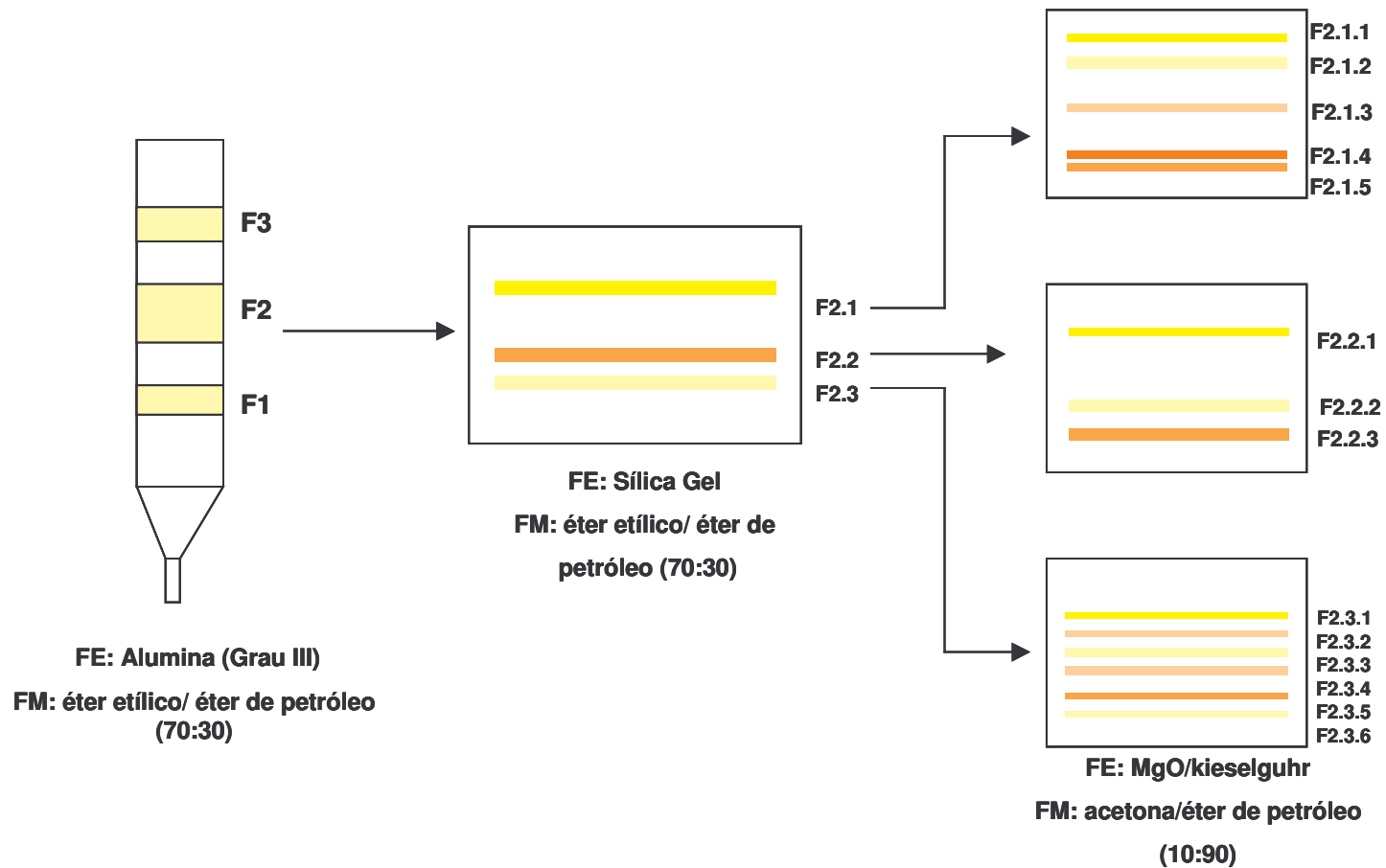


Figura 14. Esquema da separação de carotenóides monoidrolizados e epóxidos de camu-camu. A identidade das frações pode ser verificada na Tabela 11.

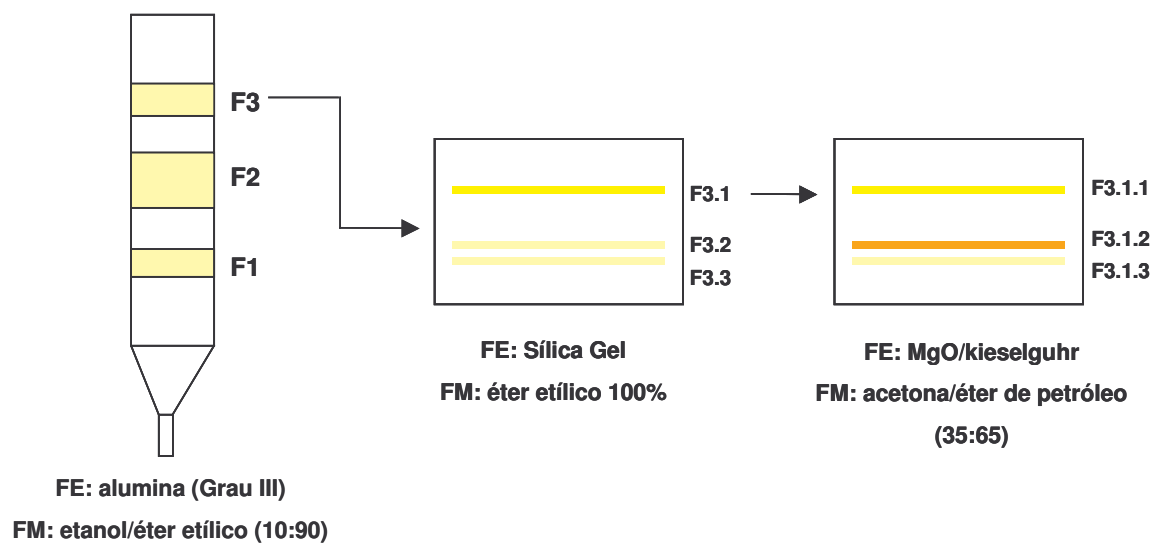


Figura 15. Esquema da separação de carotenóides polidroxilados de camu-camu. A identidade das frações pode ser verificada na Tabela 11.

5.2.1.2. Separação por fase reversa

Como esperado para colunas de fase reversa, os carotenóides polares com dois ou mais grupos hidroxila, acompanhados ou não de grupos epóxido, como neoxantina, neocromo, violaxantina, luteoxantina, 5,6,5',6'-diepóxi-luteína, taraxantina, mutatoxantina, anteraxantina, luteína e zeaxantina eluíram antes de monoidroxilados, seus respectivos epóxidos e apocarotenóides como a criptoflavina, 5,6-epóxi- β -criptoxantina, rubixantina, syntaxantina, zeínoxantina, β -criptoxantina, mutatocromo e 5,6-epóxi- β -caroteno. Por último eluíram os carotenos, β -zeacaroteno, prolicopeno, ϵ -caroteno, ζ -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno, fitoflueno, β -caroteno e licopeno (Figura 16). A separação e a identidade dos carotenóides em coluna de fase reversa C_{18} é apresentada nas Figuras 16, 17 e 18 e na Tabela 12, e em coluna de fase reversa C_{30} na Figura 19 e na Tabela 13.

Apesar de não ter sido observada a separação dos isômeros de β -caroteno em coluna de fase reversa C_{18} , os espectros de absorção obtidos pelo DAD no início e no final do pico 32 (Figuras 16, 17 e 18) indicaram a presença do 9-*cis*- β -caroteno. A análise em coluna de fase reversa C_{30} confirmou identificação, pois o 9-*cis*- β -caroteno foi eficientemente separado do isômero *all-trans*, como pode ser observado na Figura 19. Isômeros de diversos outros carotenóides, como violaxantina, luteína, rubixantina, γ -caroteno e licopeno também foram separados na coluna de fase reversa C_{30} .

O mecanismo de separação em uma coluna de fase reversa C_{30} envolve as mesmas interações observadas em coluna de fase reversa de C_{18} , entretanto, a primeira possui uma característica peculiar, que permite a separação de moléculas de acordo com sua conformação espacial e tamanho. Isto é possível devido ao tamanho do radical C_{30} ligado à sílica, que promove um encaixe diferenciado do analito com a fase estacionária. É este tipo de interação que permite uma separação mais eficaz nesta coluna, principalmente no caso dos isômeros geométrico (Sander *et al.*, 1994).

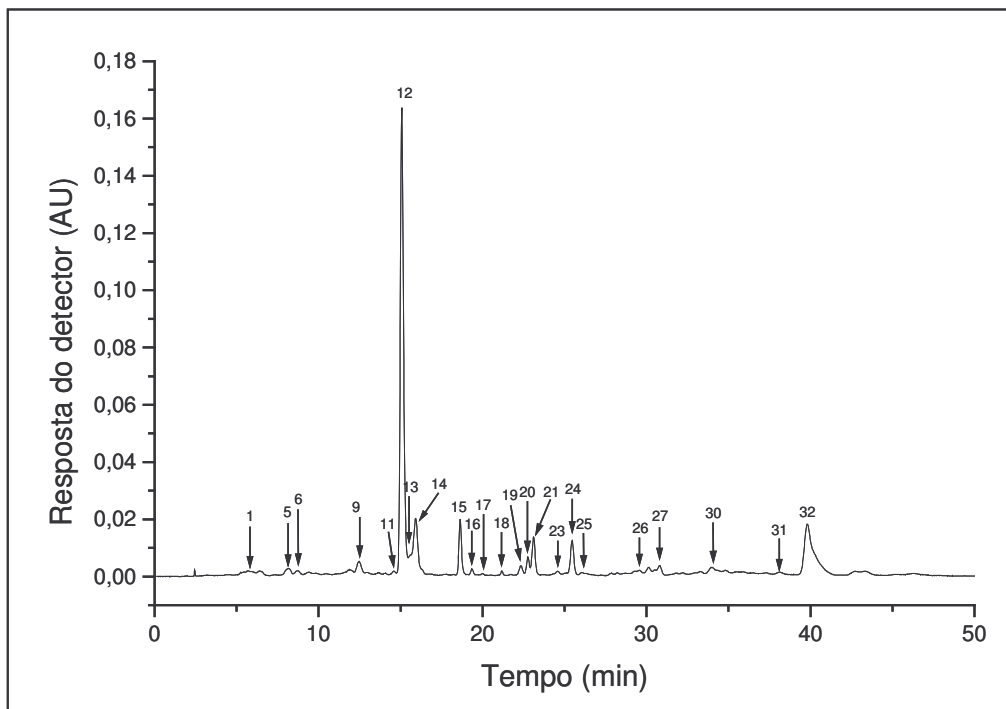


Figura 16. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Mirandópolis (06/07/02). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} monomérica Nova-Pak (4 μ m, 300 mm x 3,9 mm); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção até 50 minutos, vazão de 1 mL/min e 29 °C. A identidade dos picos está relacionada na Tabela 12.

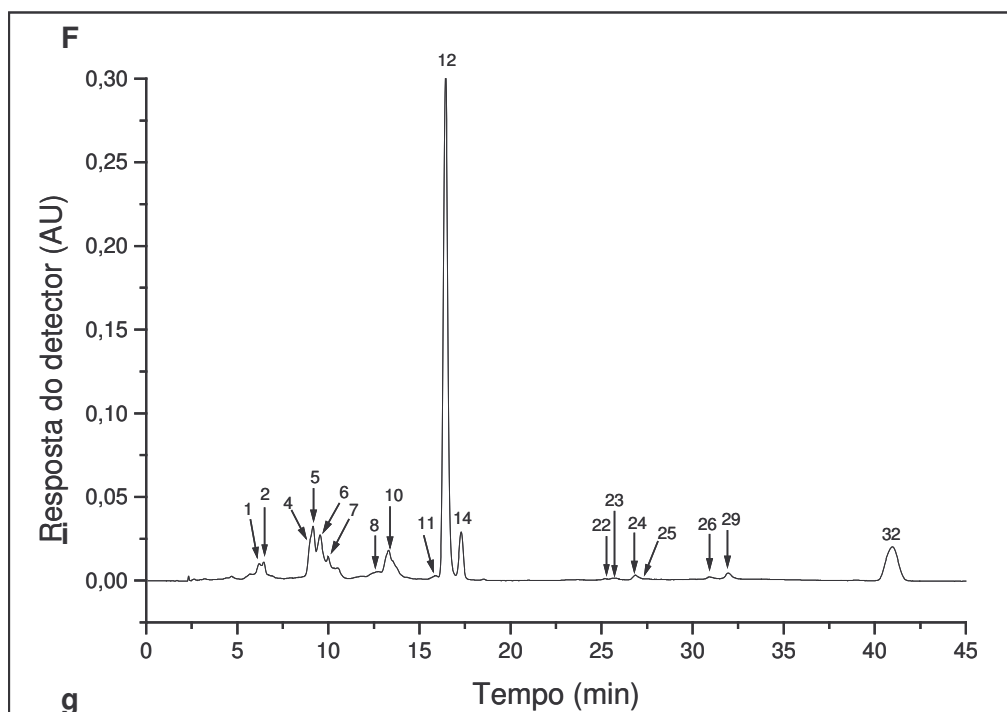


Figura 17. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Mirandópolis (13.07.03) Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 µm, 300 mm x 3,9 mm); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção até 50 minutos, vazão de 1 mL/min e 29 °C. A identidade dos picos está relacionada na Tabela 12.

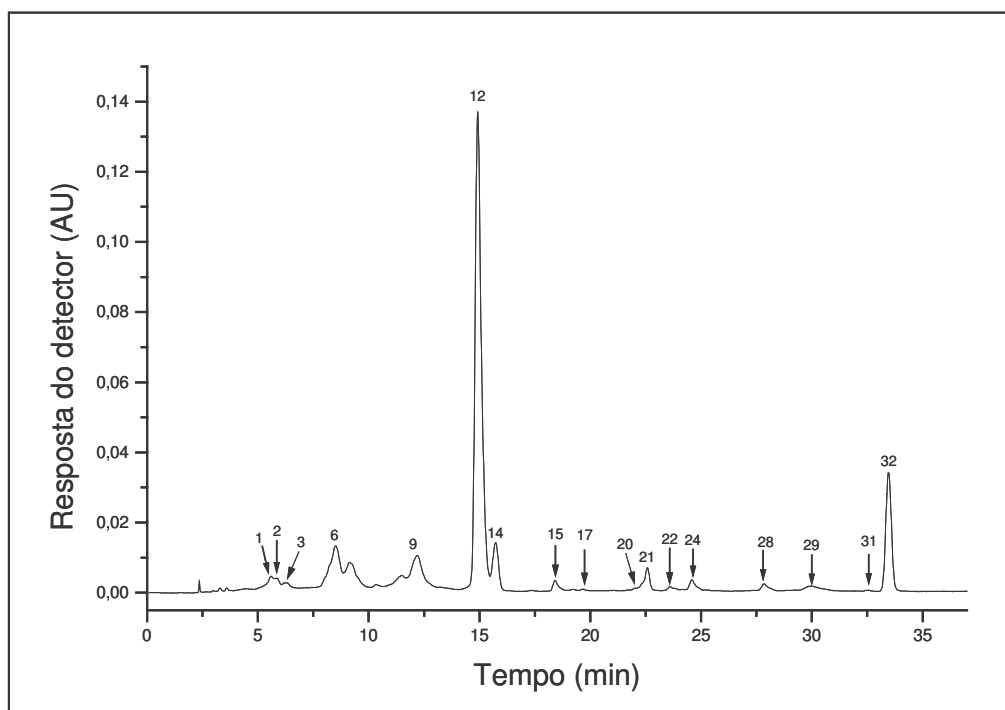


Figura 18. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides do extrato saponificado de camu-camu proveniente de Iguape (15.05.03). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} monomérica Nova-Pak ($4\ \mu\text{m}$, $300\ \text{mm} \times 3,9\ \text{mm}$); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos, e 70:0:30 em 35 minutos e mantendo esta proporção até o final, vazão de $1\ \text{mL/min}$ e $29\ ^\circ\text{C}$. A identidade dos picos está relacionada na Tabela 12.

Tabela 12. Características dos carotenóides de camu-camu separados em coluna de fase reversa C₁₈.

Nº Pico	Carotenóide	Faixa de tr (min)		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ^c	%III/II	%A _B / A _{II}
		FM1 ^a	FM2 ^b			
1	neoxantina	5,5 - 6,2	6,2	415, 440, 467	84	0
2	<i>Cis</i> -neoxantina	5,8 - 6,4	6,3 - 6,5	329, 410, 438, 466	88	21
3	neocromo	6,7 - 6,8	nd	400, 424, 447	nc	nc
4	<i>cis</i> -violaxantina	nd	8,9	328, 417, 441, 471	85	4
5	violaxantina	8,8 - 9,1	8,2 - 9,4	417, 442, 470	88	0
6	luteoxantina	8,4 - 9,4	8,8 - 10,0	398, 423, 449	115	0
7	5,6,5',6' diepóxi-luteína	9,9 - 10,1	9,9 - 10,1	411, 436, 466	77	nc
8	taraxantina (5,6-epóxi-luteína)	10,2 - 12,4	11,8 - 13,1	416, 441, 471	54	nc
9	mutatoxantina (5,8-epóxi-zeaxantina)	12,1 - 13,3	nd	337, (403), 430, 454	57	0
10	anteraxantina (5,6 epóxi-zeaxantina)	12,3 - 12,6	12,4 - 13,6	406, 426, 447, 472	32	0
11	9- <i>cis</i> -luteína	14,5 - 15,7	14,6 - 15,9	331, (420), 442, 469	23	nc
12	all- <i>trans</i> -luteína	14,9 - 16,2	15,1 - 16,4	(423), 447, 476	60	0
13	13- <i>cis</i> -luteína	15,6 - 16,7	15,6 - 17,0	331, (420), 442, 469	22	31
14	zeaxantina	15,7 - 17,1	15,9 - 17,3	(428), 454, 481	33	0
15	Não identificado	18,4	18,3 - 18,6	(423), 447, 476	63	0
16	Não identificado	19,2	18,5 - 19,4	338, (428), 453, 480	33	29
17	criptoflavina (5,8-epóxi- β -criptoxantina)	19,6 - 20,8	nd	406, 431, 453	nc	nc
18	5,6-epóxi- β -criptoxantina	21,2	20,5 - 21,2	331, (423), 447, 476	62	0
19	<i>cis</i> -rubixantina	23,2	nd	349, (437), 460, 491	30	14

20	rubixantina	23,6	nd	(437), 464, 494	59	0
21	mistura	22,5 - 23,9	23,1 - 23,4	(436), 458, (488)	0	0
22	sintaxantina	23,6 - 24,0	25,0 - 25,2	(420), 453, (484)	0	0
23	zeinoxantina ou α -criptoxantina	23,6 - 25,2	24,6 - 25,9	423, 447, 476	70	0
24	β -criptoxantina	24,5 - 26,1	25,5 - 26,9	(428), 454, 481	18	0
25	9- <i>cis</i> - β - criptoxantina	26,4	27,4	337, (425), 451, 474	0	38
26	5,6 epóxi- β - caroteno	28,6	29,6 - 29,8	(425), 447, 471	82	0
27	prolicopeno	30,8	30,8 - 31,0	(410), 441, (465)	0	0
28	5,8 epóxi- β - caroteno	27,8 - 29,2	30,7 - 31,5	(404), 428, 453	42	0
29	β -zeacaroteno	29,9 - 31,1	30,8 - 31,9	(405), 427, 453	55	0
30	ϵ -caroteno	nd	32,1 - 34,0	417, 441, 471	85	0
31	α -caroteno ^d	32,5	35,0	420, 446, 474	55	0
32	β -caroteno	33,4 - 35,2	39,8 - 41,1	(428), 454, 481	20	0
32	9- <i>cis</i> - β -caroteno	33,4 - 35,2	39,7 - 42,7	343, (423), 451, (478)	0	19
32	fitoflueno	33,4 - 35,2	39,2 - 39,5	332, 349, 366	63	0

^a FM1: fase móvel utilizada nas amostras de Iguape (ver item 4.3.3).

^b FM2: fase móvel utilizada nas amostras de Mirandópolis (ver item 4.3.3).

^c gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila.

^d não puro; nd: não detectado; nc: não calculado devido à baixa concentração ou impureza.

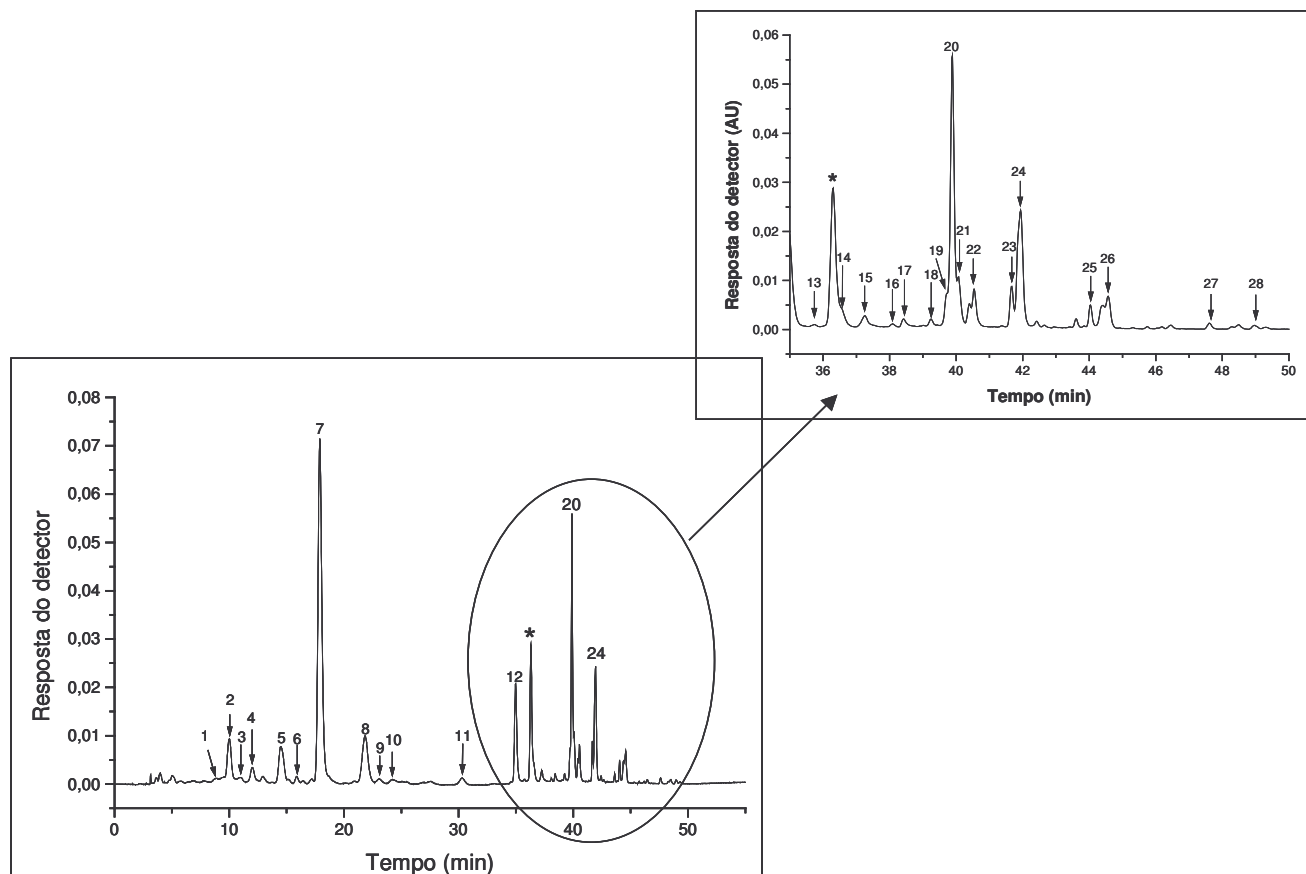


Figura 19. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides do extrato saponificado de frutos de camu-camu proveniente de Mirandópolis (06/07/02). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₃₀ polimérica marca YMC (3 µm, 250 mm x 4,6 mm), FM: gradiente de água/metanol/*tert*-metil-butil-éter (MTBE) proporção inicial 5:90:5, atingindo 0:95:5 em 12 minutos, 0:89:11 em 25 minutos, 0:75:25 em 40 minutos até concentração final de 0:50:50 em 60 minutos, vazão de 1mL/min, a 33°C. A identidade dos picos está relacionada na Tabela 13. * mistura.

Tabela 13. Características dos carotenóides separados em coluna de fase reversa C₃₀.

Nº Pico	Carotenóide	Faixa de tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	%III/II	%A _B /A _{II}
1	neoxantina	9,7 - 10,0	363, 413, 439, 468	85	0
2	violaxantina	10,0 - 10,5	363, 413, 440, 468	93	0
3	<i>cis</i> -violaxantina	11,0	363, 410, 436, 464	92	4
4	luteoxantina	12,0	398, 422, 448	98	0
5	9- <i>cis</i> -luteína	14,5	329, (416), 441, 468	41	29
6	13- <i>cis</i> -luteína	15,9	329, (415), 437, 464	51	46
7	all- <i>trans</i> -luteína	17,9	333, (420), 445, 472	66	0
8	zeaxantina	21,8	339, (424), 451, 477	30	
9	<i>cis</i> -5,6,5',6'-diepóxi- β -criptoxantina	23,1	333, 415, 439, 466	61	9
10	5,6,5',6'-diepóxi- β - criptoxantina	24,2	333, 417, 440, 466	63	0
11	não identificado	30,3	335, 446, 471	23	0
12	β -criptoxantina	35,0	(425), 451, 479	27	0
13	5,8 epoxi- β -caroteno	35,7	(405), 426, 454	50	0
13	fitoflueno ^a	35,7	328, 347, 366	140	0
14	não identificado	36,5	346, (435), 453	0	0
15	<i>cis</i> - ζ -caroteno ^a	37,3	292, 379, 400, 424	117	30
16	<i>cis</i> -rubixantina	38,1	347, 430, 454, 482	42	54
17	α -caroteno	38,4	421, 446, 474	51	0
18	rubixantina	39,2	349, (428), 456, 486	56	15
19	ζ -caroteno ^a	37,3	376, 400, 424	127	0
20	β -caroteno	39,9	(426), 452, 479	19	0
21	prolicopeno	40,1	(418), 440	0	0
22	9- <i>cis</i> - β -caroteno	40,5	338, (422), 447, 472	20	16
23	<i>cis</i> - γ -caroteno	41,9	349, 436, 461, 491	57	10

24	all- <i>trans</i> - γ -caroteno	41,7	349, 437, 461, 492	57	0
25	sintaxantina	44,0	(423), 446, (467)	0	0
26	citranaxantina	44,5	(447), 468	0	0
27	9- <i>cis</i> -licopeno	46,5	359, 442, 466, 498	71	19
28	licopeno	49,0	446, 474, 504	82	0

^a não puro.

nc: não calculado devido à baixa concentração ou impureza.

O fitoflueno (F1.1 da Figura 13, pico 32 da Figura 16, pico 13 da Figura 19) foi inicialmente identificado por apresentar espectro UV/visível, comprimentos de onda e %III/II similares aos dados da literatura (Davies, 1976; Britton, 1995), além de apresentar fluorescência característica em luz ultravioleta a 254 nm. Outra característica importante foi observada na CCD de MgO, onde o fitoflueno acompanhou a frente do solvente. Este comportamento cromatográfico se deve à presença de somente 9 I.d.c. na molécula, resultando em uma interação mais fraca com o adsorvente.

Após a análise do comportamento cromatográfico em MgO, o all-*trans*- β -caroteno (F1.2 da Figura 13, pico 32 das Figuras 16, 17 e 18, pico 17 da Figura 19), γ -caroteno (F1.6 da Figura 13, pico 20 da Figura 19) e licopeno (F1.7 da Figura 13, pico 24 da Figura 19) tiveram sua identidade confirmada ao apresentarem comprimentos de onda em éter de petróleo e %III/II similares aos encontrados por Davies (1976) e Britton (1995). Além disso, apresentaram espectros e comportamento cromatográfico semelhantes aos seus respectivos padrões, quando submetidos às mesmas condições na separação por CLAE em colunas de fase reversa C₁₈ e C₃₀.

O isômero de β -caroteno identificado como 9-*cis*- β -caroteno (pico 32 das Figuras 16, 17 e 19, pico 19 da Figura 19), mostrou espectro, comprimentos de onda, %III/II e principalmente %A_B/A_{II} semelhantes à dados da literatura (Brunner, 1997). Somado a isso, foi observado deslocamento hipsocrômico de 3 nm em relação ao all-*trans*- β -caroteno. O comportamento cromatográfico na separação por CLAE em coluna de fase reversa C₃₀, segue a ordem de eluição encontrada por Brunner (1997), que identificou conclusivamente os isômeros all-*trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, 13-*cis*- β -caroteno, 15-*cis*- β -caroteno, 9-*cis*,13-*cis*- β -caroteno, 9-*cis*,15-*cis*- β -caroteno e 9-*cis*,13'-*cis*- β -caroteno por ressonância magnética nuclear.

Um isômero *cis* de licopeno foi separado somente em coluna de fase reversa C₃₀, sendo identificado como 9-*cis*-licopeno (pico 26 Figura 19) com base

nos espectros, comprimentos de onda de absorção, %III/II (Tabela 13) comportamento cromatográfico semelhantes ao respectivo padrão, quando submetidos às mesmas condições de análise por CLAE, e dados da literatura (Nunes & Mercadante, 2004).

O α -caroteno (pico 31 das Figuras 16 e 18) foi encontrado em pequenas quantidades e teve sua identidade confirmada por co-cromatografia com padrão isolado de cenoura. Além disso, apresentou comprimentos de onda e %III/II similares aos encontrados na literatura (Davies, 1976; Britton, 1995).

O pigmento identificado como ϵ -caroteno (pico 30 da Figura 16) teve sua presença observada em algumas separações por CLAE, de amostras provenientes de Mirandópolis, porém em pequenas quantidades. O mesmo foi tentativamente identificado com base no comportamento cromatográfico em fase reversa, além de apresentar espectros de absorção no UV/visível e %III/II semelhantes a dados da literatura (Davies, 1976; Britton, 1995).

A extração de grande quantidade de amostra resultou na detecção do ζ -caroteno (F1.3 da Figura 13, pico 14 da Figura 19) nas separações em coluna de fase reversa C_{30} e por CCD de MgO. Este pigmento foi identificado com base nos comprimentos de onda e %III/II em éter de petróleo similares aos reportados por Davies (1976) e Britton (1995). Também contribuíram para a confirmação da identidade o comportamento cromatográfico em fase reversa, e em fase normal, onde o ζ -caroteno apresentou maior retenção que o β -caroteno em função da cadeia alifática, comportamento idêntico ao encontrado por Mercadante *et al.* (1998) na análise de maracujá.

O β -zeacaroteno (F1.5 da Figura 13, pico 29 das Figuras 17 e 18) teve sua identidade confirmada ao apresentar comprimentos de onda em éter de petróleo idênticos aos encontrados na literatura (Davies, 1976; Britton, 1995), bem como os comportamentos cromatográfico em fase reversa e em MgO, onde ficou

mais fortemente adsorvido que o β -caroteno, em função de possuir apenas um anel β , apesar de apresentar menor número de l.d.c., somente 9.

A identidade do 5,6-epóxi- β -caroteno e do mutacromó (5,8-epóxi- β -caroteno) (picos 26 e 28 das Figuras 16, 17 e 18 respectivamente, pico 13 da Figura 19) foram confirmadas considerando o comportamento cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} , e pelo fato dos espectros de absorção no UV/visível apresentarem comprimentos de onda máximo de 7 e 16 nm menor, respectivamente, em relação ao *all-trans*- β -caroteno, indicando a presença de grupos epóxido 5,6 e 5,8 (Davies, 1976).

O prolicopeno (pico 27 da Figura 16, pico 18 da Figura 19) foi tentativamente identificado com base no comportamento cromatográfico, comparando sua separação em colunas de fase reversa C_{18} e C_{30} , com o comportamento cromatográfico do licopeno. Considerando que a molécula do licopeno possui uma conformação espacial maior que a de um carotenóide *poli-cis* como o prolicopeno, sua interação com a fase estacionária se torna mais forte, aumentando consideravelmente o tempo de retenção do isômero *all-trans*. Além disso, o prolicopeno apresentou espectro de absorção no UV/Visível característico, com estrutura fina igual a zero e comprimentos de onda semelhantes aos encontrados na literatura (Mercadante *et al.*, 1998; Mercadante & Egeland, 2004).

A *all-trans*- β -criptoxantina (F2.2.1 da Figura 14, pico 24 das Figuras 16, 17 e 18, pico 12 da Figura 19) teve sua identidade confirmada por co-cromatografia com padrão em placa de sílica gel, e por apresentar comportamento cromatográfico e espectro idêntico ao do padrão, quando submetidos às mesmas condições na separação por CLAE em coluna de fase reversa C_{18} . Os comprimentos de onda máximo na região do visível juntamente com a %III/II mostraram-se semelhantes aos encontrados na literatura (Davies, 1976; Britton, 1995; Silva & Mercadante, 2002a). Outro fator decisivo foram os resultados das derivatizações químicas, negativo para reação de epóxido e positivo para reação

de isomerização, havendo deslocamento hipsocrômico de 2 nm após a adição de iodo, levando à confirmação da predominância da forma geométrica *trans* no pigmento isolado por placa.

Em algumas amostras foi possível observar a separação, em coluna de fase reversa C₁₈, de um isômero *cis* de β -criptoxantina (pico 25 da Figura 17). O mesmo apresentou deslocamento hipsocrômico de 3 nm em relação ao isômero *all-trans*, além do aparecimento de um pico *cis* a 337 nm, o que permitiu a identificação do carotenóide juntamente com a diminuição da estrutura fina vibracional (Britton, 1995) e do comportamento cromatográfico. Considerando que β -criptoxantina e β -caroteno possuem cromóforos idênticos, os espectros de seus respectivos isômeros foram comparados entre si e com os dados obtidos por Brunner (1997), resultando na identificação tentativa como 9-*cis*- β -criptoxantina.

A zeínoxantina (β , ϵ -caroteno-3-ol) (pico 23 das Figuras 16 e 17) foi identificada ao apresentar comportamento cromatográfico em fase reversa característico de um monoidroxilado e comprimentos de onda semelhantes aos encontrados por Assunção & Mercadante (2003) e Hamano & Mercadante (2001). Entretanto, não se pode excluir a possibilidade do pigmento ser identificado como α -criptoxantina (β , ϵ -caroteno-3'-ol), pois a espectrofotometria não é capaz de diferenciar estes carotenóides (estruturas da Figura 11). Ao contrário do que foi feito por Hamano & Mercadante (2001), a reação de metilação para confirmação da estrutura não foi realizada devido à baixa concentração do carotenóide em questão.

De acordo com Britton (1995), a presença de um grupo aldeído terminal conjugado à cadeia de um carotenóide, estende o cromóforo promovendo um aumento de 25 a 30 nm no $\lambda_{\text{máx}}$. Além disso, provoca a diminuição da estrutura fina espectral à medida que aumenta o comprimento da cadeia. Com base na ausência de estrutura fina nos espectros obtidos pelo DAD, o pico 22 (Figura 17 e 18 e Tabela 12) e os picos 21 e 22 (Figura 19 e Tabela 13) foram identificados como apocarotenóides.

Entretanto, a co-cromatografia do extrato bruto saponificado com padrões de β -apo-8'-carotenal, β -apo-10'-carotenal e β -apo-12'-carotenal (Picos 1, 2 e 3 da Figura 20, respectivamente) em coluna de fase reversa C_{18} , revelou a ausência destes compostos no extrato analisado.

Assim sendo, foi considerada a possibilidade da formação de um artefato de análise. Um produto resultante de uma condensação aldólica (Figura 21) entre o solvente de extração, a acetona, e o apocarotenóide (β -apo-10'-carotenal). Esta reação, que ocorre em meio básico, ou seja, durante a saponificação, deu origem a um cetocarotenóide com 3 carbonos a mais na cadeia, identificado como syntaxantina. Justificando assim, a ordem de eluição observada em fase reversa (Tabela 12), onde a syntaxantina (pico 22 da Figuras 17 e 18, pico 21 da Figura 19) ficou mais retida na fase estacionária quando comparada ao padrão de β -apo-10'-carotenal.

Este fato foi confirmado quando utilizou-se acetato de etila, além de acetona, como solvente de extração para as análises dos extratos saponificados por CCD, o que permitiu que nem todo β -apo-10'-carotenal fosse convertido em syntaxantina.

Apesar do β -apo-10'-carotenal (F2.1.1 da Figura 14) ter sido isolado por fase normal, este se encontrava em quantidade insuficiente para realização dos testes químicos. Além disso, não foram realizadas análises de extratos não saponificados, devido à grande quantidade de interferentes lipídicos, o que dificultaria ainda mais a identificação dos pigmentos.

Comportamento semelhante foi observado para a citranaxantina (pico 22 da Figura 19) na análise em coluna de fase reversa C_{30} . Este cetocarotenóide corresponde ao produto da condensação aldólica do β -apo-8'-carotenal com a acetona. Contudo a presença deste apocarotenóide não foi detectada nas separações cromatográficas realizadas, provavelmente devido à baixa concentração.

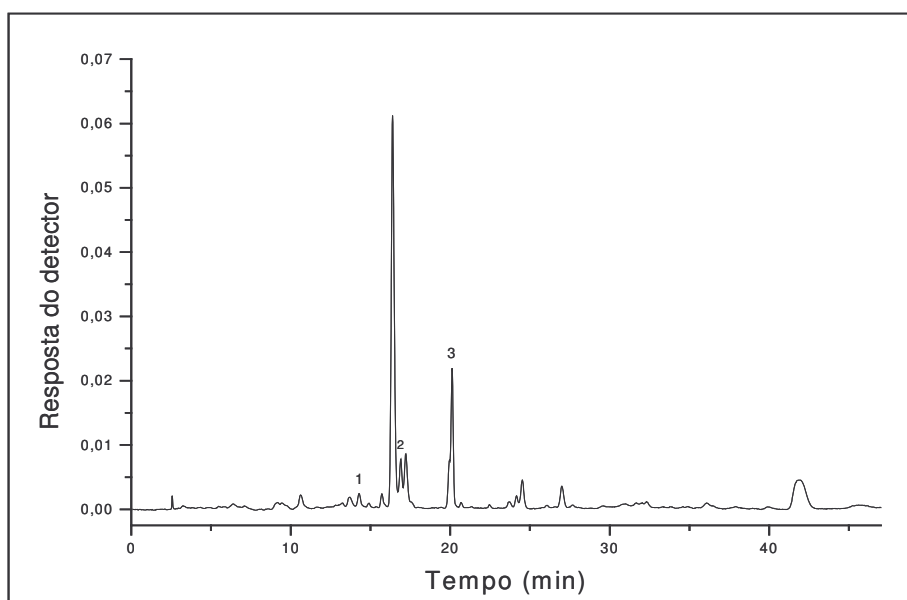


Figura 20. Cromatograma, obtido por CLAE, da co-cromatografia do extrato bruto saponificado de camu-camu com padrões de β -apo-8'-carotenal (Pico 1), β -apo-10'-carotenal (Pico 2) e β -apo-12'-carotenal (Pico 3). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} monomérica Nova-Pak ($4\ \mu\text{m}$, $300\ \text{mm} \times 3,9\ \text{mm}$); FM: gradiente de acetonitrila/água/acetato de etila, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 minutos e mantendo esta proporção o fim, vazão de $1\ \text{mL/min}$ e $29\ ^\circ\text{C}$.

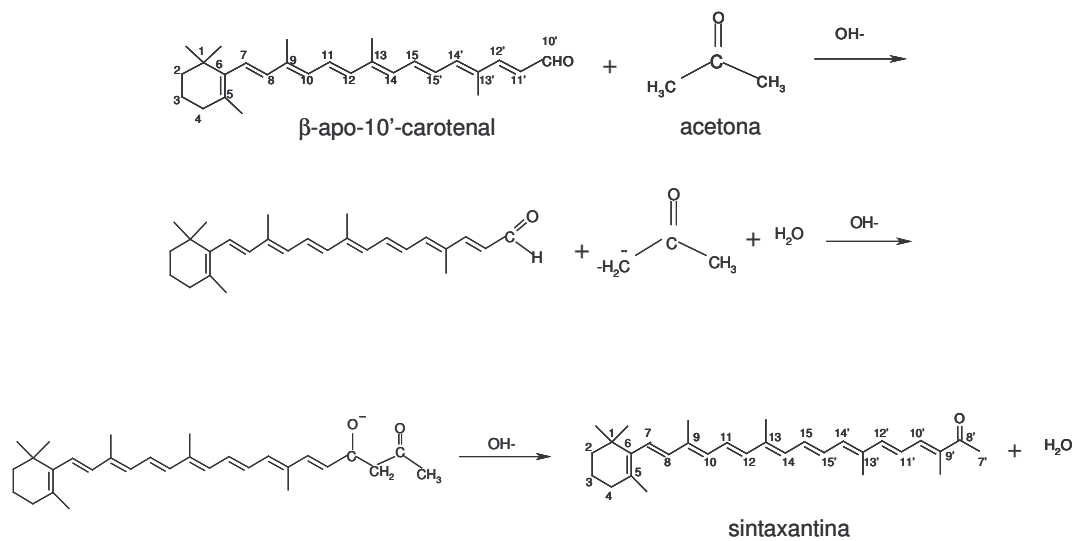


Figura 21. Esquema da reação de condensação aldólica entre a acetona e o β -apo-10'-carotenal.

O pigmento identificado como rubixantina (F2.2.3 da Figura 14, pico 20 das Figuras 16 e 18) apresentou comprimentos de onda em etanol, e %III/II similares aos encontrados por Davies (1976) e Britton (1995), além de espectro e comportamento cromatográfico idêntico ao do padrão sob as mesmas condições de análise por CLAE em coluna de fase reversa C₁₈. O resultado negativo da reação de epóxido, indicado pela ausência de deslocamento hipsocrômico após adição de ácido também contribuiu para a identificação. Em colunas de fase reversa C₃₀ e C₁₈, foi possível observar a separação de um isômero *cis* de rubixantina (pico 19 da Figura 16, pico 16 da Figura 19) que apresentou deslocamento hipsocrômico de 4 nm em relação ao isômero *all-trans*, bem como menor da estrutura fina e aparecimento de pico *cis* a 349 nm (Britton, 1995).

As identidades de 5,6-epóxi- β -criptoxantina (pico 18 da Figura 16) e da criptoflavina (5,8-epóxi- β -criptoxantina – pico 17 das Figuras 16 e 18) foram confirmadas com base no comportamento cromatográfico em coluna de fase reversa C₁₈, característicos de compostos monoidroxilados, além de apresentar deslocamento hipsocrômico de 7 e 23 nm, respectivamente, no comprimento de onda máximo da região do visível em relação a *all-trans*- β -criptoxantina, evidenciando a presença de um grupo epóxido 5,6 e 5,8 nas respectivas moléculas.

A *all-trans*-luteína (F3.1.1 da Figura 15, pico 12 da Figuras 16, 17 e 18, pico 7 da Figura 19) e a zeaxantina (F3.1.2 da Figura 7.6, pico 14 das Figuras 16, 17 e 18, pico 8 da Figura 19) foram identificadas com base nos comprimentos de onda em éter de petróleo e etanol, e nas %III/II similares aos dados da literatura (Davies, 1976; Britton, 1995). Os espectros dos pigmentos, obtidos em espectrofotômetro e no DAD, e o comportamento cromatográfico em coluna de fase reversa C₁₈, mostraram-se idênticos aos dos respectivos padrões quando submetidos às mesmas condições de análise. O resultado positivo da reação de isomerização da luteína, indicado por um deslocamento hipsocrômico de 2 nm, levou a confirmação da predominância da forma geométrica *trans* na fração F3.1.1. isolada por CCD.

A identificação dos isômeros 9-*cis*-luteína (pico 11 das Figuras 16 e 17, pico 5 da Figura 19) e 13-*cis*-luteína (pico 13 da Figura 16, pico 6 da Figura 19) foi baseada na presença e intensidade do pico *cis* a 340 nm (Brunner, 1997) Estes isômeros tiveram suas identidades confirmadas pela ordem de eluição em coluna C₃₀ segundo Brunner (1997), além do deslocamento hipsocrômico de 4 e 7 nm no $\lambda_{\text{máx}}$ apresentado pelos isômeros 9-*cis*-luteína e 13-*cis*-luteína respectivamente, em relação à all-*trans*-luteína e das %III/II e %A_B/A_{II} (Tabelas 12 e 13) semelhantes aos reportados por Emenheiser *et al.* (1995) e Brunner (1997).

Foi observada a presença de um isômero *cis* de zeaxantina, coeluyendo com o pigmento all-*trans*, porém a posição da isomeria não foi identificada.

A mutatoxantina (F3.1.3 da Figura 15, pico 9 das Figuras 16 e 18) teve sua identidade confirmada ao apresentar espectro, comprimentos de onda em éter de petróleo e %III/II semelhantes aos reportados por Davies (1976) e Britton (1995). Além disso, foram observados resultados negativos para as reações de metilação e epóxido. A primeira reação mostrou que não ocorreu alteração de polaridade do produto de reação em relação ao pigmento original quando ambos foram analisados por CCD de sílica gel. Já o espectro de absorção do produto da reação de epóxido mostrou que não houve deslocamento hipsocrômico em relação ao β -caroteno, em virtude da ausência de um grupo 5,6-epóxido.

Durante a análise cromatográfica dos carotenóides por CLAE, em coluna de fase reversa C₁₈, os picos 7, 8 e 10 (Figura 17) foram tentativamente identificados como 5,6,5',6'-diepóxi-luteína, taraxantina (5,6-epóxi-luteína) e anteraxantina (5,6-epóxi-zeaxantina), respectivamente. Os epóxidos 5,6 de luteína e zeaxantina apresentaram um deslocamento hipsocrômico de 6 nm em relação ao pigmento original, enquanto que o 5,6,5',6'-diepóxi-luteína apresentou uma diminuição de 11 nm no comprimento de onda máximo da região do visível. Sendo que todos os epóxidos apresentaram %III/II ligeiramente maiores às xantofilas correspondentes.

Os carotenóides luteoxantina (Pico 6 das Figuras 16, 17 e 18) e violaxantina (F3.2 da Figura 15, pico 5 das Figuras 16 e 17) foram identificados com base no comportamento cromatográfico em fase reversa, característico de compostos que possuem em sua estrutura dois grupos hidroxila e dois grupos epóxido. Somado a isso, no caso da luteoxantina, o espectro de absorção na região do UV/visível, apresentou comprimento de onda máximo cerca de 31 nm abaixo do valor encontrado para β -caroteno, sugerindo a presença de um grupo epóxido 5,6 e um 5,8, valores, os quais foram semelhantes aos encontrados na literatura (Cano & Marín, 1992). Já para violaxantina, foi observado um deslocamento hipsocrômico de 38 nm após a adição de ácido, devido ao rearranjo de 2 grupos 5,6-epóxi para 5,8-epóxi. Além disso, a mesma apresentou comprimentos de onda máximos na região do visível, em etanol e éter de petróleo, e %III/II similares aos reportados por Davies (1976) e Britton (1995).

A presença de um isômero *cis* de violaxantina (pico 4 da Figura 17, pico 3 da Figura 19) foi observada nas separações por CLAE em colunas de fase reversa C₁₈ e C₃₀, contudo sua separação ocorreu somente em 2 amostras provenientes de Mirandópolis (amostras de 06/07/02 e 12/07/03). Enquanto que nas demais amostras o isômero co-eluiu com a forma majoritária *all-trans*. Fato que foi comprovado pela obtenção de espectros diferentes no início e final do pico 5 (Figuras 16, 17 e 18), os quais apresentaram alterações na estrutura fina (%II/II_{*all-trans*}=88, %II/II_{*cis*}=85), comprimento de onda máximo de absorção 1 nm menor em relação ao isômero *all-trans*, além do aparecimento do pico *cis* a 328 nm (%A_B/A_I=4). O isômero tentativamente identificado como 9-*cis*-violaxantina, apresentou espectro de absorção no Uv/visível semelhante ao encontrado por Phillip *et al.* (1999) que identificaram os isômeros de 9-*cis*, 13-*cis* e 15-*cis*-violaxantina por comparação com padrões.

Assim como a violaxantina, a neoxantina (F3.3 da Figura 15, pico 1 das Figuras 16, 17 e 18) também sofreu deslocamento hipsocrômico após a adição de ácido, porém de apenas 18 nm, revelando a presença de um único grupo epóxido 5,6. Sua identificação foi assegurada pelo comportamento cromatográfico

observado em fase reversa e em fase normal, característicos de compostos poli-hidroxilados, ou seja, rápida eluição em fase reversa e grande retenção em fase normal de sílica gel e alumina. Além dos comprimentos de onda máximos de absorção em diferentes solventes e %III/II semelhantes aos dados encontrados na literatura (Davies, 1976; Britton, 1995).

O pico 2 (Figuras 17 e 18) foi tentativamente identificado como um isômero *cis* de neoxantina, devido ao espectro de absorção obtido pelo DAD revelar o aparecimento de um pico *cis* a 329 nm e um deslocamento hipsocrômico no $\lambda_{\text{máx}}$ de 2 nm em relação ao isômero *all-trans*.

O neocromo (pico 3 da Figura 18) foi identificado ao apresentar comportamento cromatográfico em fase reversa também característico de um composto poli-hidroxilado, e o comprimento de onda máximo de absorção cerca de 14 nm inferior aos valores encontrados para a neoxantina, sugerindo a presença de um grupo epóxido 5,8 na estrutura.

O perfil de carotenóides encontrado nos frutos de camu-camu cultivados no estado de São Paulo foi semelhante ao reportado por Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004). Com auxílio da CLAE-DAD e da CLAE-EM, estes autores identificaram luteína, β -caroteno e zeaxantina como carotenóides principais nos frutos de camu-camu provenientes da cidade de Belém do Pará. Também foram detectados em baixas concentrações neoxantina, β -criptoxantina, 5,6-epóxi- β -caroteno e *cis*- β -caroteno.

5.2.2. Composição quantitativa

A *all-trans*-luteína foi o carotenóide principal encontrado nos frutos de camu-camu, de ambas as regiões, perfazendo de 45% a 55% do total de carotenóides. Em seguida apareceram o β -caroteno contribuindo com 13% e 20%, do total de carotenóides encontrado para os frutos de Iguape e Mirandópolis, respectivamente, bem como a violaxantina e a luteoxantina, que juntas somaram

11% e 13%. A Tabela 14 apresenta a composição quantitativa de carotenóides de camu-camu.

5.2.2.1. Efeitos geográficos

O teor de carotenóides totais ($P=0,0002$) foi significativamente superior nos frutos de Mirandópolis que nos de Iguape, sendo que a variação mais nítida se deu nas concentrações de luteína e β -caroteno. Enquanto que a luteína ($P<0,0001$) apresentou teor 3,7 vezes superior ao encontrado nos frutos de Iguape, para o β -caroteno ($P=0,0044$) este valor superou 1,9 vezes.

Esta diferença nos níveis de β -caroteno foi refletida no valor de vitamina A. Apesar disso, os teores de provitamina A ($P=0,2647$) 1,7 vezes superiores nos frutos de Mirandópolis, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação as concentrações observadas no camu-camu de Iguape.

Os carotenóides minoritários também apresentaram concentrações significativamente maiores nos frutos procedentes de Mirandópolis, tais como, neoxantina (5,6 vezes, $P=0,0064$), *cis*-neoxantina (7,6 vezes, $P=0,0047$), violaxantina (7,8 vezes, $P=0,0001$), luteoxantina (2,8 vezes, $P=0,0017$) e anteraxantina (3,7 vezes, $P=0,0137$).

Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, os níveis de zeaxantina (1,6 vezes, $P=0,0525$) e 5,6,5',6'-diepóxi-luteína (5,5 vezes, $P=0,1002$) também foram maiores nos frutos procedentes de Mirandópolis. Por outro lado, os teores de β -criptoxantina (1,2 vezes, $P=0,1765$), 5,8-epóxi- β -caroteno (4,0 vezes, $P=0,0621$) e β -zeacaroteno (2,7 vezes, $P=0,3462$) foram superiores no camu-camu de Iguape. Além disso, carotenóides como o neocromo, mutatoxantina, rubixantina, *cis*-rubixantina e α -caroteno não foram detectados nas análises quantitativas dos frutos de Mirandópolis.

Tabela 14. Composição de carotenóides ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de casca) e valor de vitamina A (RE/100g de casca) de camu-camu.

No. ^a	Carotenóide	Concentração em ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	
		Iguape ^b	Mirandópolis ^b
1	neoxantina	$3,9 \pm 1,4$	$20,8 \pm 10,9$
2	<i>cis</i> -neoxantina	$2,1 \pm 1,5$	$16,0 \pm 8,4$
3	neocromo	$0,9 \pm 0,7$	nd
4	<i>cis</i> -violaxantina	nd	$21,2 \pm 30,0$
5	violaxantina	$12,0 \pm 15,7$	$94,0 \pm 26,2$
6	luteoxantina	$21,5 \pm 10,9$	$60,0 \pm 16,9$
7	5,6,5',6'-diepóxi-luteína	$4,7 \pm 6,6$	$26,1 \pm 4,9$
8	taraxantina	$2,1 \pm 3,0$	$8,6 \pm 7,1$
9	mutatoxantina	$9,2 \pm 8,0$	nd
10	anteraxantina	$12,9 \pm 18,2$	$47,7 \pm 18,5$
11	9- <i>cis</i> -luteína	$0,9 \pm 1,0$	$3,4 \pm 1,7$
12	all- <i>trans</i> -luteína	$160,5 \pm 93,1$	$601,9 \pm 75,6$
14	zeaxantina	$22,9 \pm 10,6$	$38,0 \pm 10,3$
15	não identificado	$0,8 \pm 0,8$	nd
16	não identificado	nd	$2,1 \pm 0,9$
17	criptoflavina	$0,5 \pm 0,4$	nd
19	<i>cis</i> -rubixantina	$1,0 \pm 1,4$	nd
20	rubixantina	$1,7 \pm 2,0$	nd
21	mistura	$5,4 \pm 4,4$	nd
22	sintaxantina	$0,4 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,6$
23	zeinoxantina	$0,9 \pm 0,7$	$1,3 \pm 1,0$
24	all- <i>trans</i> - β -criptoxantina	$8,3 \pm 2,0$	$6,6 \pm 0,4$
25	<i>cis</i> - β -criptoxantina	$1,6 \pm 1,2$	$0,3 \pm 0,4$
26	5,6-epóxi- β -caroteno	$0,03 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,7$

28	5,8-epóxi- β -caroteno	$3,6 \pm 2,0$	$0,9 \pm 1,3$
29	β -zeacaroteno	$8,6 \pm 7,7$	$3,1 \pm 3,4$
31	α -caroteno	$0,1 \pm 0,1$	nd
32	β -caroteno	$72,8 \pm 60,9$	$142,3 \pm 19,4$
	Total de carotenóides	$363,4 \pm 217,4$	$1096,4 \pm 198,0$
	Valor de Vitamina A (RE/100g)	$14,1 \pm 10,9$	$24,8 \pm 3,7$

^a Numerado de acordo com os cromatogramas das Figura 16, 17 e 18.

^b Média e desvio padrão de três lotes.

nd: não detectado. RE: retinol equivalente.

A diferença de cor, observada visualmente, indicou que os frutos analisados não apresentavam o mesmo estágio de maturação, resultando numa grande variação quantitativa de carotenóides entre os lotes de uma mesma região. Dentre os carotenóides majoritários, foram observadas variações significativas nos teores de neoxantina ($P=0,0001$), *cis*-neoxantina ($P=0,0061$), violaxantina ($P=0,03$), luteoxantina ($0,0005$), anteraxantina ($P=0,0008$), luteína ($P=0,0041$), zeaxantina ($P=0,0084$) e β -caroteno para os lotes procedentes de Mirandópolis. Enquanto que para os lotes originários de Iguape as diferenças significativas foram observadas nos níveis de *cis*-neoxantina ($P=0,0392$), violaxantina ($P=0,0056$), luteoxantina ($0,0114$), 5,6,5',6'-diepóxi-luteína ($P=0,0003$), mutatoxantina ($P=0,0036$), anteraxantina ($P=0,0014$), luteína ($P=0,0026$), zeaxantina ($P=0,0309$) e 5,8-epóxi- β -caroteno ($P=0,0278$).

O teor de carotenóides, significativamente maior, encontrado no camu-camu cultivado em Mirandópolis se deve, provavelmente, ao fato da cidade de Mirandópolis estar localizada numa região de clima mais quente quando comparada ao clima da região de Iguape. Isso pode ser observado claramente nos gráficos apresentados da Figura 22, que mostram as temperaturas no período de maio a agosto de 2003, quando foram colhidas as amostras para as análises quantitativas. Em Mirandópolis, as temperaturas foram bem maiores, chegando a 31°C em agosto, enquanto que em Iguape não ultrapassaram os 23°C. Além disso, Mirandópolis também apresentou maior o índice pluviométrico no período de colheita comparado à cidade Iguape, como pode ser observado nos gráficos da Figura 23.

A influência do clima na biossíntese de carotenóides ainda não é totalmente conhecida, entretanto sabe-se que a luz é um fator de extrema importância, sendo um dos principais responsáveis pelas variações nas concentrações de carotenóides e também pela maior variedade de pigmentos encontrados numa planta (Britton, 1998).

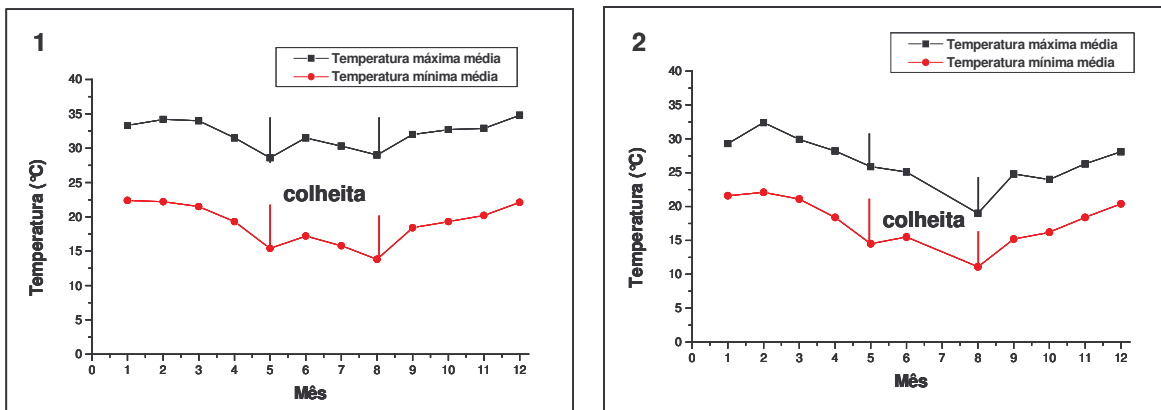


Figura 22. Gráficos de temperatura referentes a 2003, nas cidades de Mirandópolis (1) e Iguape (2).

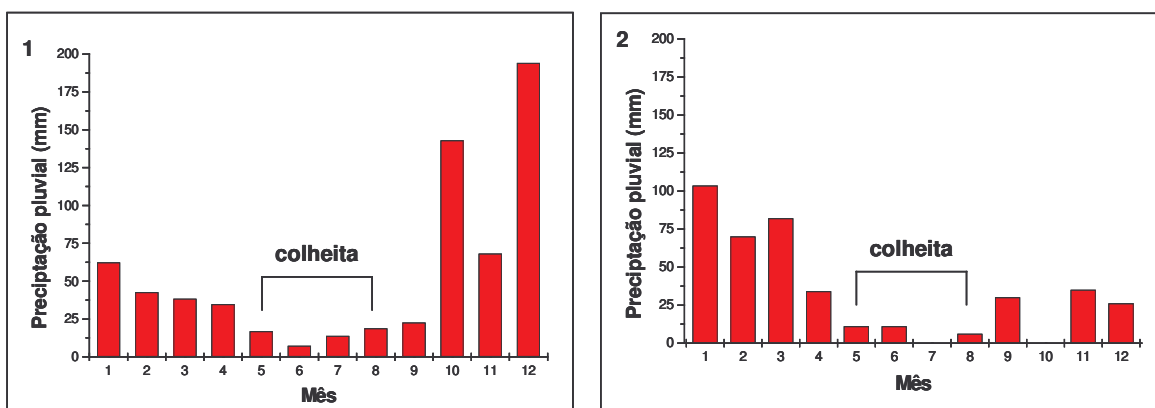


Figura 23. Gráficos de precipitação pluvial (mm) de 2003, em Mirandópolis (1) e Iguape (2).

Assunção & Mercadante (2003) encontraram maiores níveis de carotenóides em caju cultivado na região Nordeste do Brasil que em frutos do Sudeste, onde a luminosidade solar e as temperaturas são inferiores. O mesmo foi observado no estudo sobre a composição de carotenóides de acerola (*Malpighia glabra*) (Cavalcante & Rodriguez-Amaya, 1992) que demonstrou teores de carotenóides notavelmente inferiores nos frutos procedentes do estado de São Paulo, com concentração de β -caroteno 5 a 6 vezes menor que as observadas nos frutos cultivados nos estados do Ceará e Pernambuco.

Seguindo a mesma tendência, estudos anteriores com goiaba (Padula & Rodriguez-Amaya, 1986) e mamão papaya (Kimura & Rodriguez-Amaya, 1991), produzidos na quente e ensolarada região Nordeste, também apresentaram níveis mais elevados de β -caroteno e outros carotenóides em relação aos frutos da região Sudeste.

Esta parece ser a principal razão para concentrações de carotenóides superiores encontradas nas amostras de Mirandópolis.

Além disso, sabe-se que o amadurecimento das frutas e a biossíntese de carotenóides estão interligados e juntos são influenciados por vários fatores ambientais. A luz novamente parece ser o principal fator para carotenogênese em frutas (Hirschberg, 1998).

Estudos feitos com tomates mostraram que, o fruto amadureceu e tornou-se vermelho na ausência de luz, mesmo depois de ter sido apanhado. A intensidade de luz, entretanto, afetou a quantidade de carotenóides sintetizada. Sendo que a temperatura também pode ser considerada um fator importante, à medida que amadurecimento e síntese de carotenóides são mais lentos em frutas mantidas a baixas temperaturas (Goodwin, 1980).

John *et al.* (1970) e Mercadante & Rodriguez-Amaya (1998) estudaram a composição de carotenóides de manga em três estádios de maturação e

relataram que na maioria das variedades o teor de carotenóides aumenta consideravelmente durante a maturação. Sendo que ocorre uma síntese preferencial de carotenos no estágio parcialmente maduro, contribuindo para um aumento na proporção de carotenos em relação às xantofilas no estágio maduro. No estudo da composição de carotenóides de mamão papaya (*Carica papaya* L.), Cano *et al.* (1996) também encontraram uma elevação nos níveis de carotenóides no estágio maduro, especialmente nos teores de licopeno.

Em relação à elevada concentração de epóxidos nos frutos camu-camu, a resposta pode estar nos diferentes estádios de maturação dos lotes. Razungles *et al.* (1996) observaram durante a análise de carotenóides de uvas, que os teores de epóxidos como 5,6-epóxi-luteína, luteoxantina e violaxantina apresentaram um comportamento peculiar durante o período de maturação, mostrando que o aumento das concentrações não foi proporcional ao amadurecimento e concluíram que este pode ser o período chave na mudança entre as proporções dos carotenóides. O mesmo foi reportado por John *et al.* (1970) na análise de carotenóides de manga. Os autores constataram níveis de epóxi-carotenóides muito superiores nos estádios verde e completamente maduro quando comparados aos teores encontrados durante o processo de maturação.

Independentemente da variação no teor de carotenóides entre os frutos das duas regiões, o camu-camu não pode ser considerado uma boa fonte de pro-vitamina A. Isso pode ser observado ao comparar os teores de pro-vitamina A encontrados no camu-camu ($14,1 \pm 10,9$ e $24,8 \pm 3,7$ RE/100g para Iguape e Mirandópolis, respectivamente) com as concentrações encontradas em folhas verdes, como o brócoli (*Brassica oleracea*) (397 RE/100g) e o espinafre (*Spinacea oleracea*) (538 RE/100g) (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1998) que são consideradas fontes ricas em pro-vitamina A e são facilmente encontradas durante o ano todo.

5.3. Composição de antocianinas

5.3.1. Purificação e confirmação da estrutura

O extrato bruto concentrado, cromatografado em papel nacional, com HCl 1% resultou no aparecimento de duas bandas mal definidas após 18 horas de corrida. Uma delas, a zona 1 (Z1) apresentou menor tamanho e coloração menos intensa que a zona 2 (Z2), indicando baixa concentração de pigmentos. A Z2 era mais larga e apresentava diferentes tonalidades, indicando a presença de uma mistura de antocianinas como pode ser observado no esquema da Figura 24.

Devido ao resultado insatisfatório da separação com HCl 1% tentou-se separar diretamente as antocianinas, por cromatografia em papel (CP), usando BFW (1-butanol/ácido fórmico/água (20:5:12)) como fase móvel, sem passar pela etapa prévia de purificação. No entanto, não foi obtida uma separação eficiente, pois houve sobreposição de bandas e mistura de frações. Isso pode ter ocorrido devido à presença de interferentes como açúcares, ácidos e outros flavonóides não antociânicos que impossibilitaram a separação como ocorreu após a cromatografia com HCl 1% que elimina estes interferentes (Figura 25).

Por estarem muito próximas, as bandas Z1 e Z2, resultantes da separação com HCl 1%, foram recortadas juntas, eluídas com metanol e concentradas, gerando o extrato parcialmente purificado. Este foi recromatografado em papel Whatman 3 mm com BFW, separando-se em 4 bandas, denominadas Z1, Z2, Z3 e Z4, após 20 horas de corrida (Figura 26). No entanto, a Z3 apresentava-se em concentração muito superior as demais, sendo a única em quantidade suficiente para análises posteriores.

A análise da Z3 por CLAE (Figura 27) mostrou a presença de cianidina-3-glucosídeo como antocianina majoritária (pico B) e pequenas quantidades de outra antocianina (pico A), a qual não foi detectada na separação do extrato total de antocianinas de camu-camu devido à baixa concentração.

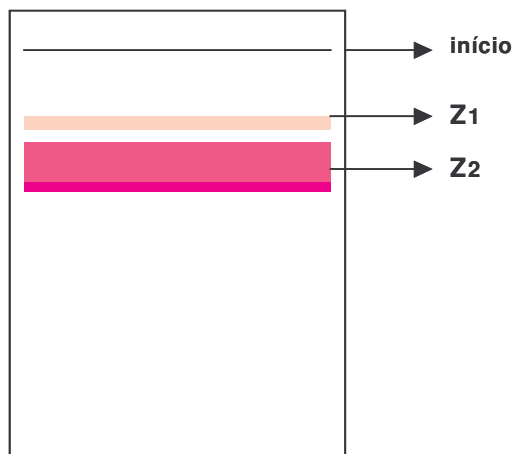


Figura 24. Esquema do cromatograma do extrato bruto após desenvolvimento por 18 horas em HCl 1%. (Valor de R_f : $Z_1=0,26$, $Z_2=0,52$).

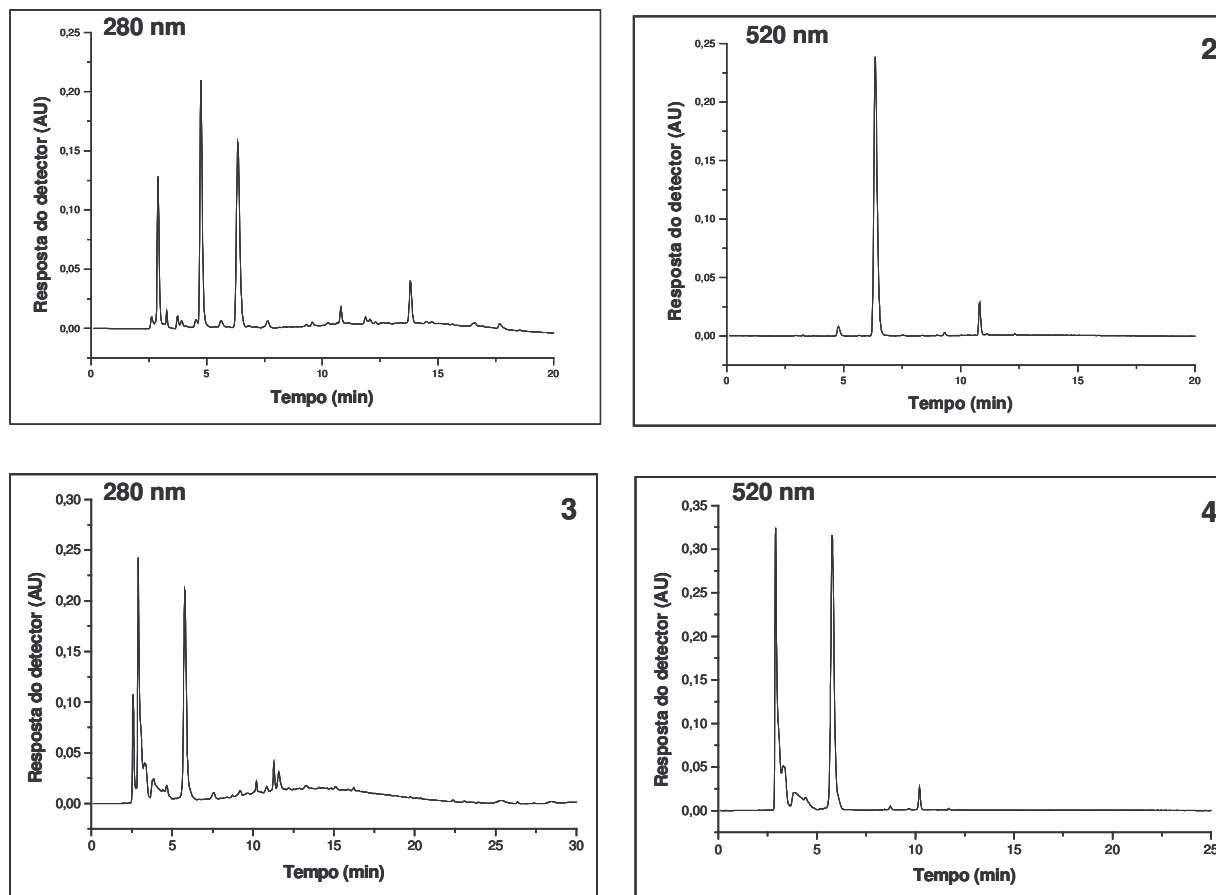


Figura 25. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos bruto (1) e (2); e parcialmente purificado por cromatografia em papel com HCl 1% como fase móvel (3) e (4), processados a 280 nm e 520 nm.

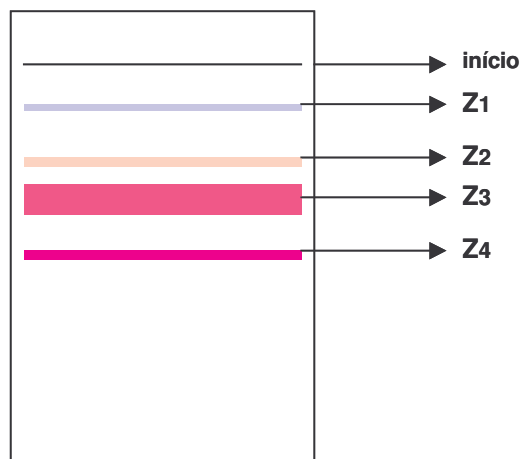


Figura 26. Esquema do cromatograma em papel do extrato parcialmente purificado após desenvolvimento por 20 horas em BFW. (Valor de R_f : $Z_1=0,29$, $Z_2=0,37$, $Z_3=0,40$, $Z_4=0,51$).

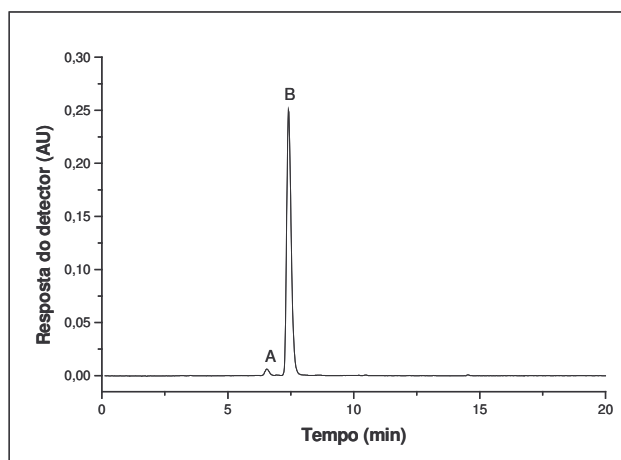


Figura 27. Cromatograma, obtido por CLAE, da fração 3 (Z_3) das antocianinas de camu-camu. Pico A: não identificado, Pico B: cianidina-3-glucosídeo. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Shim-Pak CLC-ODS ($5\ \mu\text{m}$, $250 \times 4,6\ \text{mm}$); FM: gradiente de 4% ácido fosfórico aquoso/acetonitrila partindo de 85:15, atingindo 20:80 em 25 minutos e mantendo esta proporção no restante da corrida, vazão de $1\ \text{mL/min}$ à 29°C . Processamento a $520\ \text{nm}$.

Levando em consideração os compostos coloridos, a cromatografia em papel foi um bom método de purificação, uma vez que o pigmento majoritário teve 97,6% de pureza a 520 nm. Por outro lado, a Figura 28 demonstrou que esta antocianina não estava pura, pois a mesma apresentou apenas 17,4% de pureza em relação aos flavonóides não antociânicos ainda presentes no extrato parcialmente purificado.

Com o intuito de retirar os flavonóides não antociânicos, o extrato total foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna, utilizando Amberlite XAD-7 como fase estacionária. Os cromatogramas apresentados na Figura 29 mostraram que a cromatografia em coluna proporcionou a retirada de grande quantidade de interferentes. Além disso, a cromatografia em papel confirmou a retirada de açúcares livres durante a purificação do extrato (Figura 30).

O extrato parcialmente purificado por cromatografia em coluna foi submetido à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), resultando na separação de cinco frações (F1, F2, F3, F4 e F5) (Figura 31). Como a HSCCC é essencialmente um tipo cromatografia de partição líquido-líquido, as antocianinas analisadas por esta técnica foram submetidas a um processo contínuo de partição entre as duas fases e separadas de acordo com seus coeficientes de partição. Considerando que a fase estacionária é constituída por solventes apolares, a ordem de eluição das frações é consequência de menor retenção das antocianinas mais polares, que possuem maior número de hidroxilas e açúcares em sua estrutura, em relação às antocianinas de menor polaridade, que tiveram maior interação com a fase estacionária.

Em função da baixa concentração das frações F1, F2 e F3, apenas F4 e F5 foram analisadas individualmente por CLAE-UV/Vis-EM. Os cromatogramas da separação das frações F4 e F5 estão apresentados nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

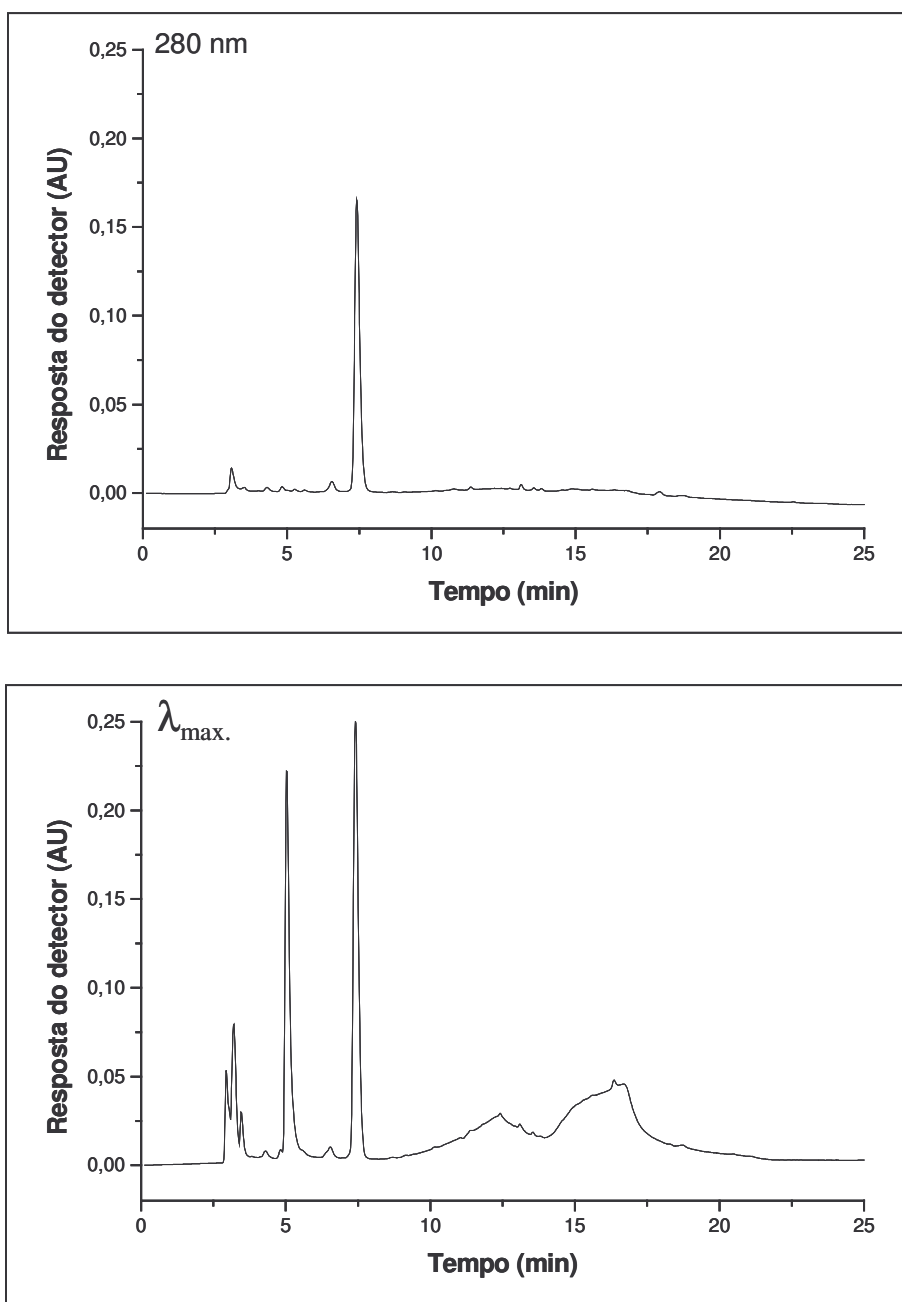


Figura 28. Cromatogramas da Z3, obtidos por CLAE, processados no $\lambda_{\text{máx}}$ e a 280 nm.

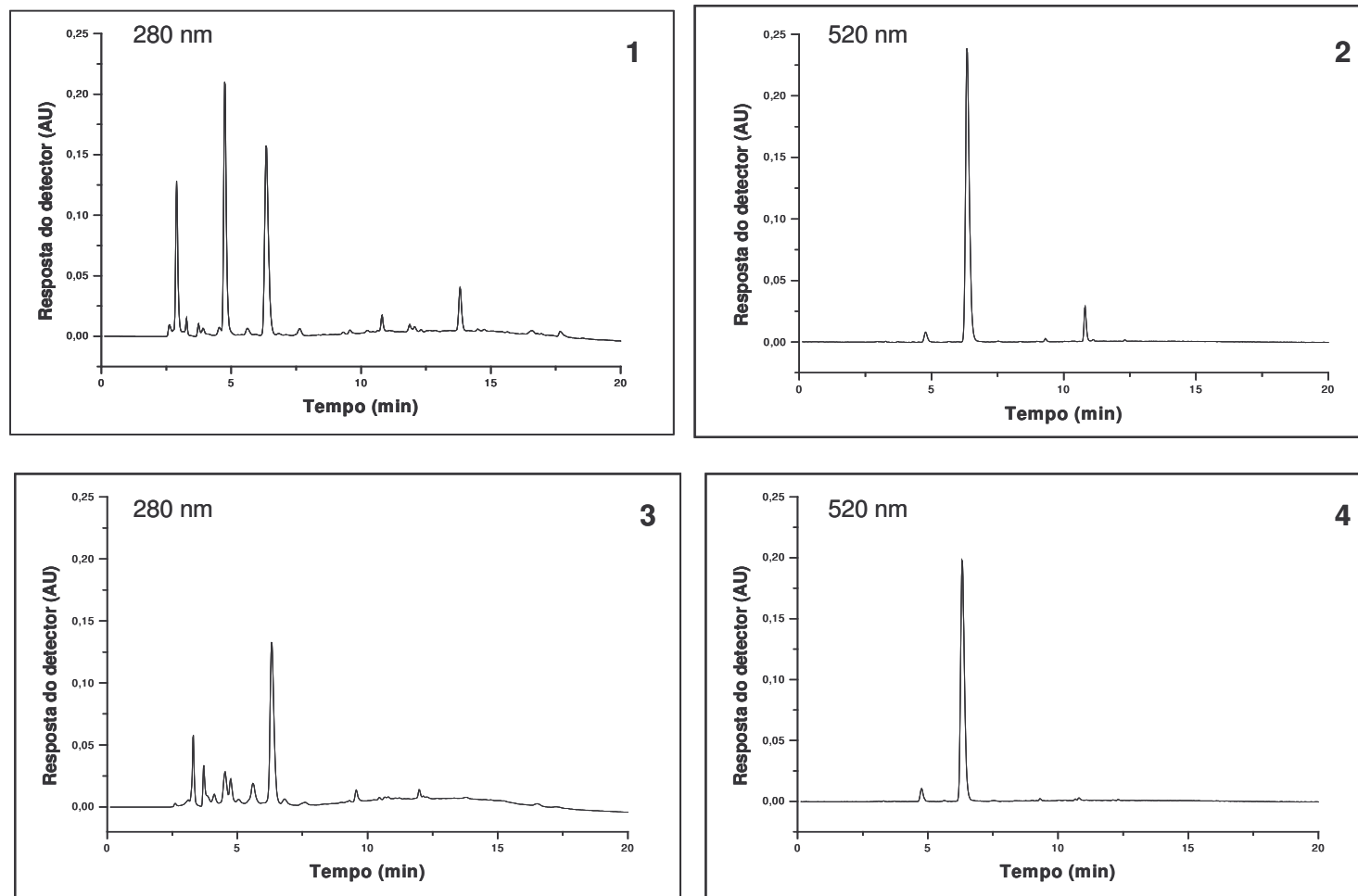


Figura 29. Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos bruto (1) e (2); e parcialmente purificado por cromatografia em coluna de Amberlite XAD-7 (3) e (4), processados a 280 nm e 520 nm.

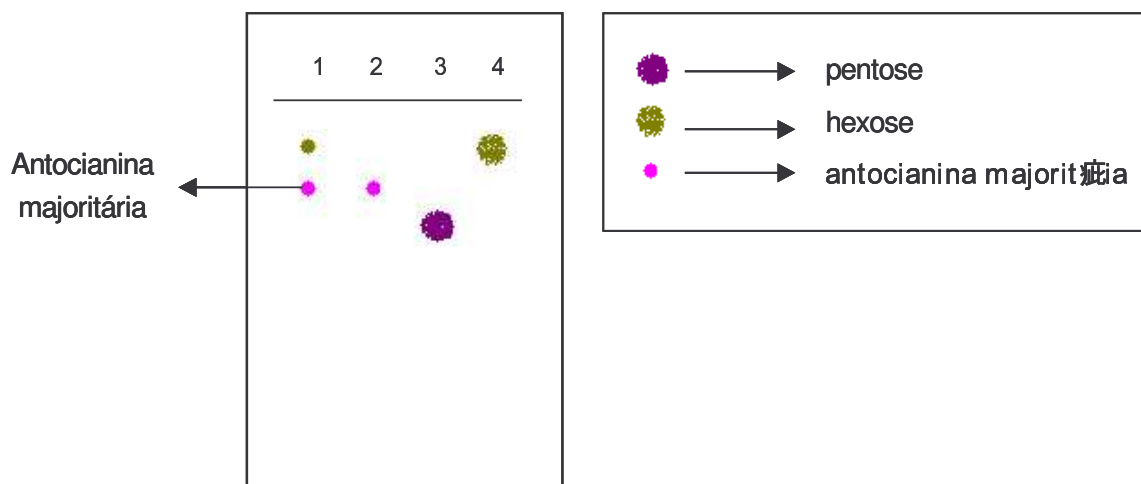


Figura 30. Esquema da separação de açúcares, por cromatografia em papel, dos extratos bruto e parcialmente purificado (1: extrato bruto, 2: extrato parcialmente purificado, 3: padrão de arabinose e 4: padrão de glucose).

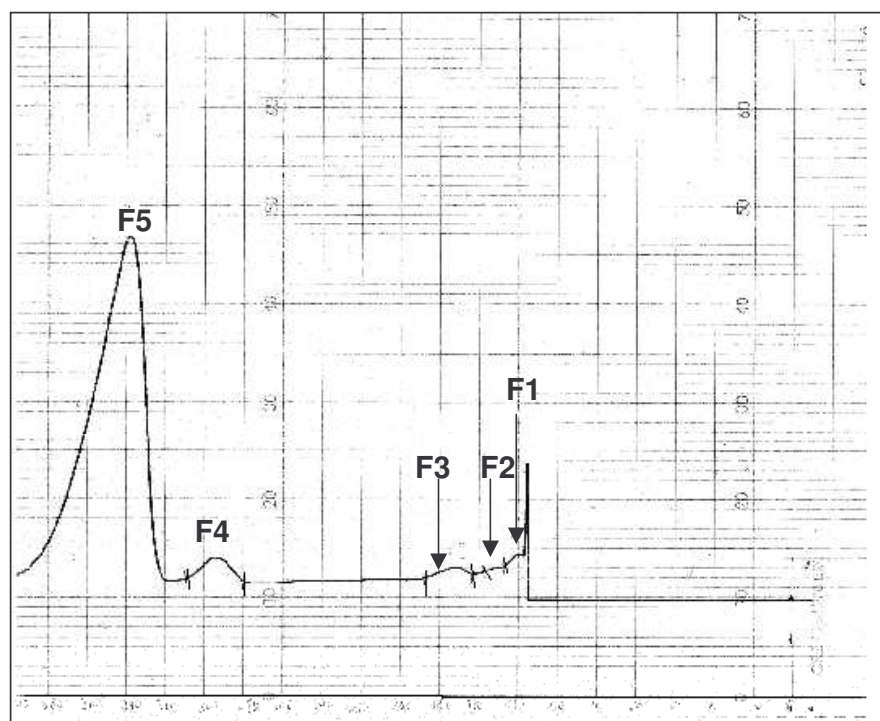


Figura 31. Cromatograma, obtido por HSCCC, do extrato parcialmente purificado de camu-camu. Condições cromatográficas: fase móvel MTBE/n-butanol/acetonitrila/água (2/2/1/5) + 0,1% TFA, modo isocrático de 0 a 360 minutos, vazão 3,5 mL/min, a 890 rpm. Processamento a 520 nm.

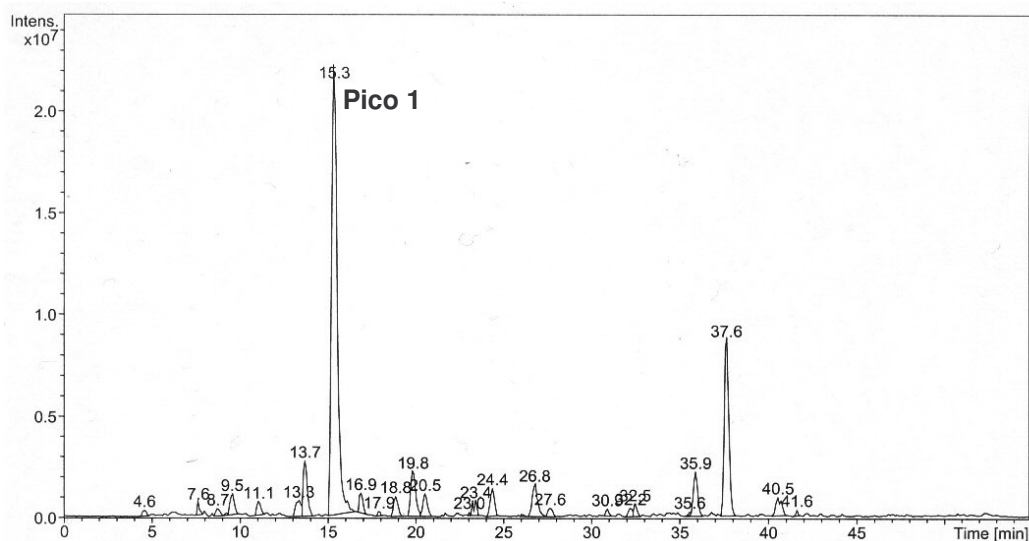


Figura 32. Cromatograma da F4, obtido por CLAE-EM. Condições cromatográficas: coluna RP-12 Synergi MaxRO (250 x 4,6 mm), FM: sistema solvente A (solvente A - água/acetonitrila/ácido fórmico - 87:3:10 e solvente B - água/acetonitrila/ácido fórmico – 40:50:10), vazão 0,5 mL/min; sistema solvente B (solvente A - 2% de ácido acético e solvente B - água/acetonitrila– 20:80), vazão 0,35 mL/min.

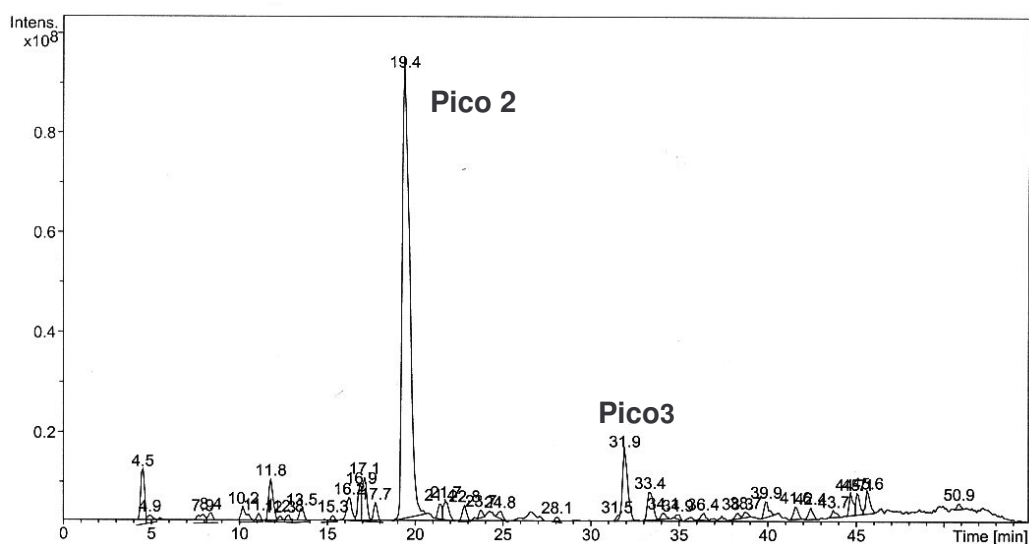


Figura 33. Cromatograma da F5, obtido por CLAE-EM. Condições cromatográficas: idem Figura 32.

Os espectros de massas de antocianinas foram analisados levando sempre em consideração a presença do íon correspondente à antocianidina e o íon molecular, quando os espectros são obtidos por ionização por eletrospray (Baldi *et al.*, 1995; Revilla *et al.*, 1999; Degenhardt *et al.*, 2000).

O espectro de massas do pico principal da F4 (pico 1 Figuras 32 e 34, Tabela 15) revelou um íon $[M]^+$ a m/z 303, que corresponde a antocianidina delphinidina. Considerando o íon molecular de 465 u.m., a diferença de 162 u.m. se deve à presença de uma hexose.

A análise da F5 por CLAE-UV/Vis-EM resultou na separação de dois picos principais, os picos 2 e 3. O espectro de massas do pico 2 (Figuras 33 e 34, Tabela 15) apresentou íon molecular de 449 u.m e revelou um íon $[M]^+$ a m/z 287, que corresponde a antocianidina cianidina. Novamente, a diferença de 162 u.m. corresponde à uma hexose. Já o espectro de massas do pico 3 (Figuras 33 e 34, Tabela 15) apresentou íon molecular de 477 u.m e íon $[M]^+$ a m/z 287 que também corresponde a cianidina. Contudo, neste caso, a diferença de 190 u.m. revela um composto diferente dos comumente encontrados em antocianinas, tais como pentoses, hexoses, desoxihexose e ácidos cinâmicos.

As Figuras 32 e 33 também mostraram que a técnica de HSCCC também não foi eficiente para purificar completamente as antocianinas de camu-camu. Assim, com o intuito de obter pureza que permitisse análise por RMN, as frações F4 e F5 foram finalmente purificadas por CLAE semi-preparativa.

Foi empregada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN 1H) para identificar conclusivamente as antocianinas principais de camu-camu. Os espectros de RMN de 1H das antocianinas majoritárias das F4 e F5, estão apresentados na Figura 35. A identidade destas antocianinas foi confirmada como delphinidina-3-glucosídeo (F4) e cianidina-3-glucosídeo (F5), por comparação das atribuições dos deslocamentos com dados da literatura (Kim *et al.*, 1989; van Calsteren *et al.*, 1991 e Pedersen *et al.*, 1993).

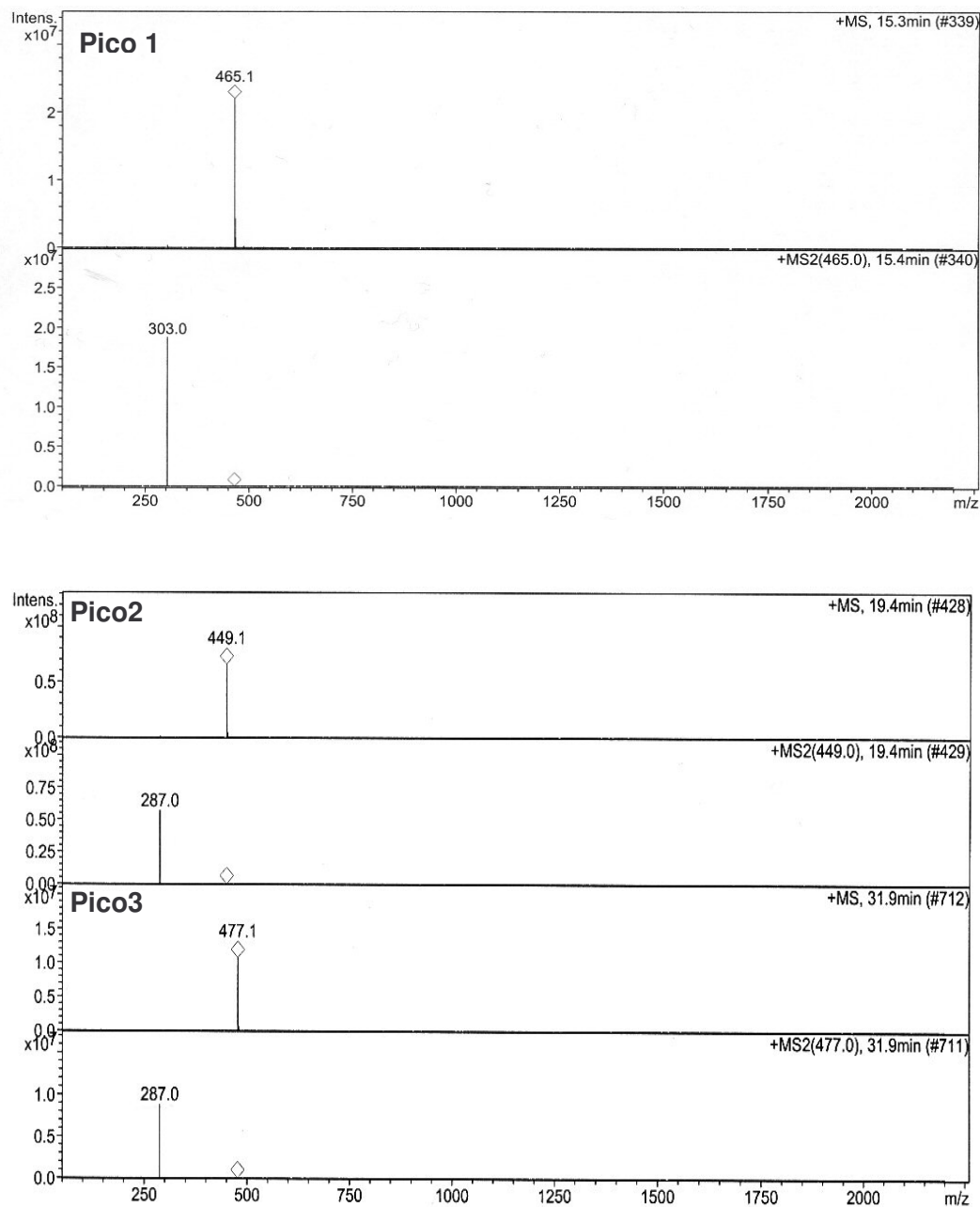


Figura 34. Espectros de massas das antocianinas de camu-camu. Pico 1: delfinidina-3-hexose, pico 2: cianidina-3-hexose, pico 3: cianidina.

Tabela 15. Características, obtidas por CLAE-MS das antocianinas de camu-camu.

pico ^a	pigmento	t _R (min)	[M ⁺] (<i>m/z</i>)	[M-açúcar] ⁺ (<i>m/z</i>)
1	delfinidina-3-hexose ^b	15,3	465	303
2	cianidina-3- hexose ^b	19,4	449	287
3	cianidina-3-acetil-pentose ^c	31,9	477	287

^a Numerado a partir do cromatograma da Figura 1.

^b glucose ou galactose ou manose.

^c os outros compostos ligados a molécula não foram identificados.

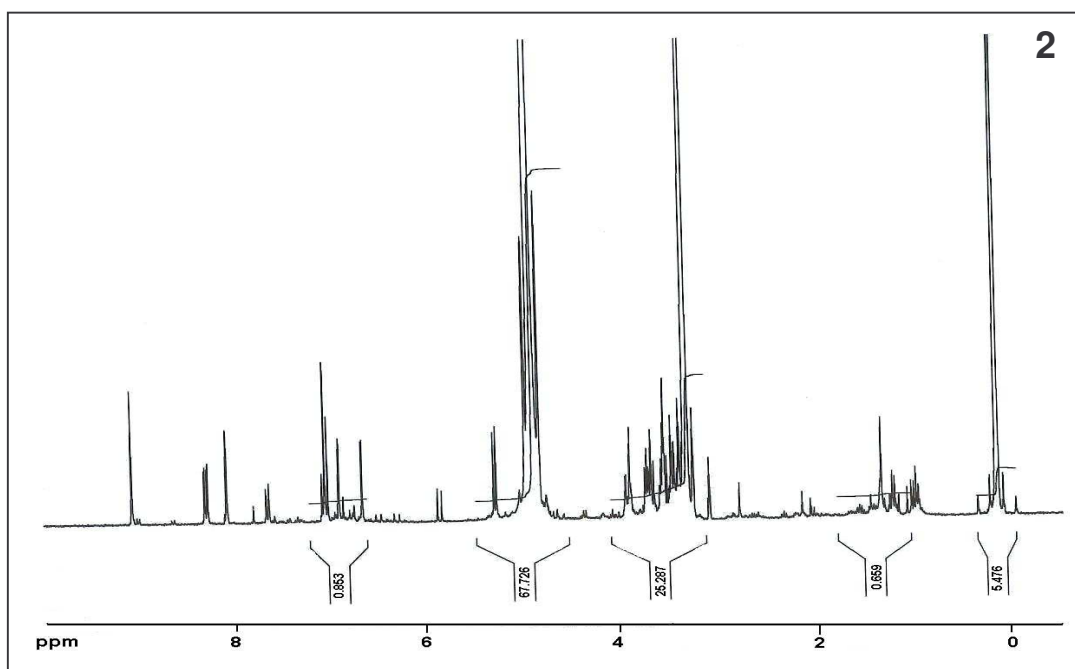
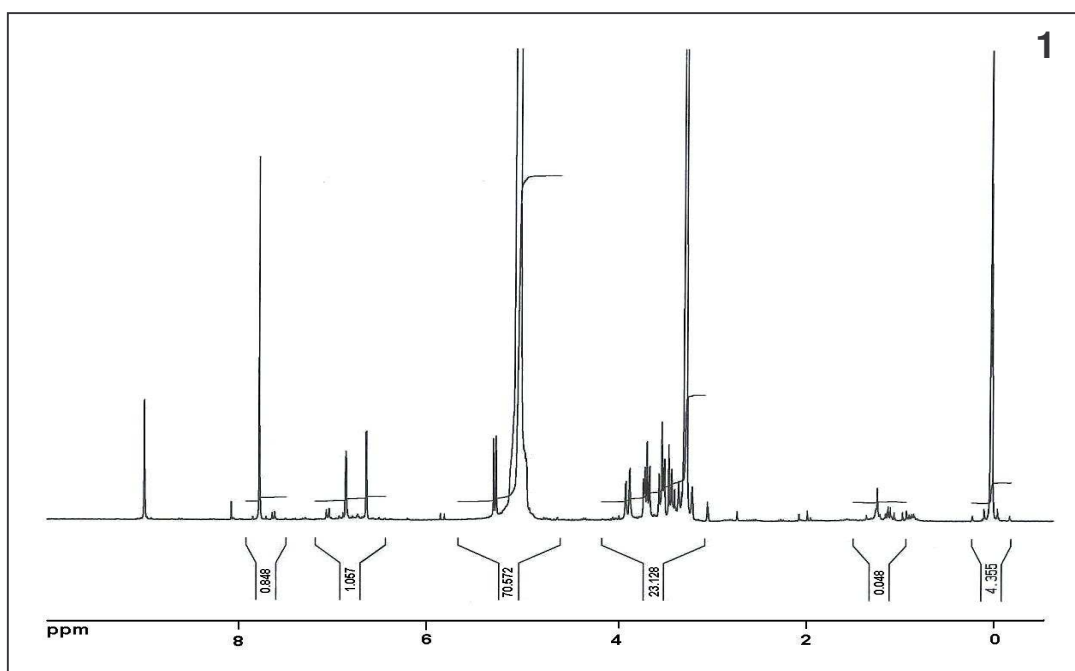


Figura 35. Espectros de delphinidina-3-glucosídeo (1) (F4) e cianididina-3-glucosídeo (2) (F5) obtidos por RMN em CD₃OD + TFA.

O extrato total de antocianinas de camu-camu também foi analisado por CLAE-DAD, em coluna de fase reversa C₁₈ e revelou a presença de nove antocianinas nas amostras provenientes de Mirandópolis (Figura 36) e de apenas seis delas nos frutos de Iguape (Figura 37).

Conforme esperado para uma coluna de fase reversa C₁₈, eluíram primeiramente as antocianinas mais polares, ou seja, as com maior número de moléculas de açúcares, e aquelas que possuem em sua estrutura maior número de grupos hidroxílicos no anel. A Tabela 16 apresenta a ordem de eluição das antocianinas do extrato bruto de camu-camu.

A comparação dos comprimentos de onda máximos de absorção, obtidos pelo DAD, das antocianinas de camu-camu com os valores da literatura (Francis, 1982; Hong & Wrolstad, 1990) indicou que, provavelmente a antocianidina do pico 8 é a pelargonidina, enquanto que a antocianidina dos picos 2, 3, 5 e 9 pode ser cianidina ou peonidina, e a antocianidina dos picos 1, 4, 6 e 7 pode ser malvidina, delphinidina ou petunidina.

Utilizando para comparação os espectros de cianidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo, conclusivamente identificadas por ¹H RMN, e dados da literatura (Wrolstadt *et al.*, 2001), a presença de um pico de absorção à aproximadamente 320 nm nos espectros dos picos 8 e 9 (Figuras 38, 39 e 40; Tabela 16) indicou a presença de ácidos cinâmicos em duas antocianinas de camu-camu.

Apesar do uso do DAD acoplado à CLAE permitir a análise das características espectrais que fornecem informações sobre glicosilação e acilação (Hong & Wrolstadt, 1990), este método não é capaz de diferenciar pigmentos com tempo de retenção semelhantes se estes também possuem características espectrais semelhantes (Figura 40), tornando-o pouco conclusivo.

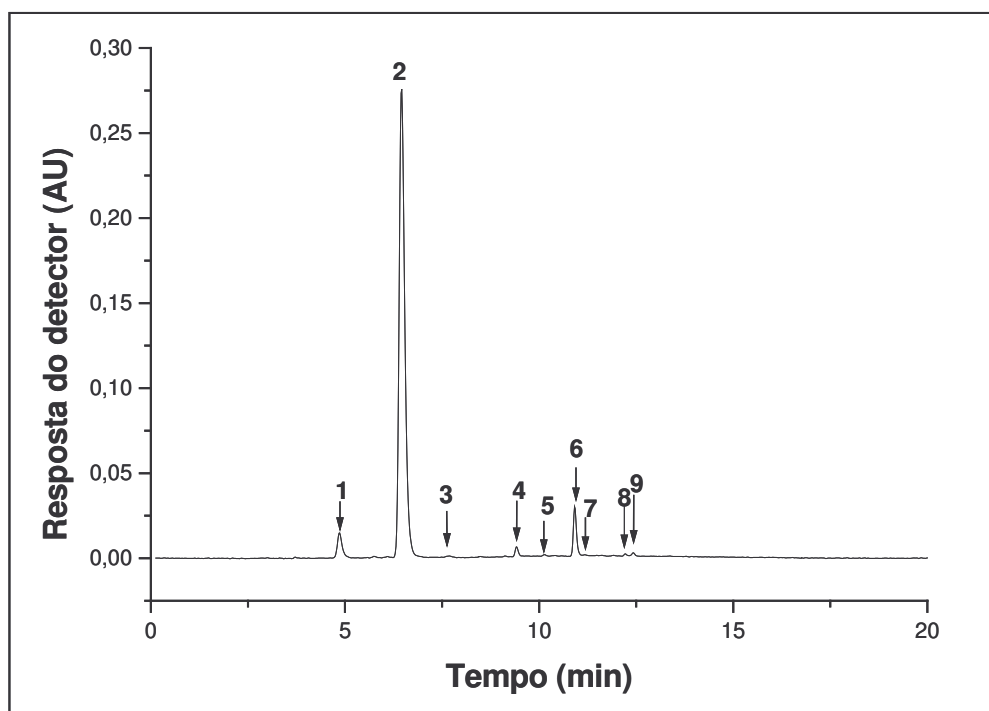


Figura 36. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto de antocianinas de frutos de camu-camu de Mirandópolis. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Shim-Pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm); FM: gradiente de 4% ácido fosfórico aquoso/acetonitrila partindo de 85:15, atingindo 20:80 em 25 minutos e mantendo esta proporção no restante da corrida, vazão de 1 mL/min à 29°C. Processamento a 520 nm. A identidade dos picos está apresentada na Tabela 16.

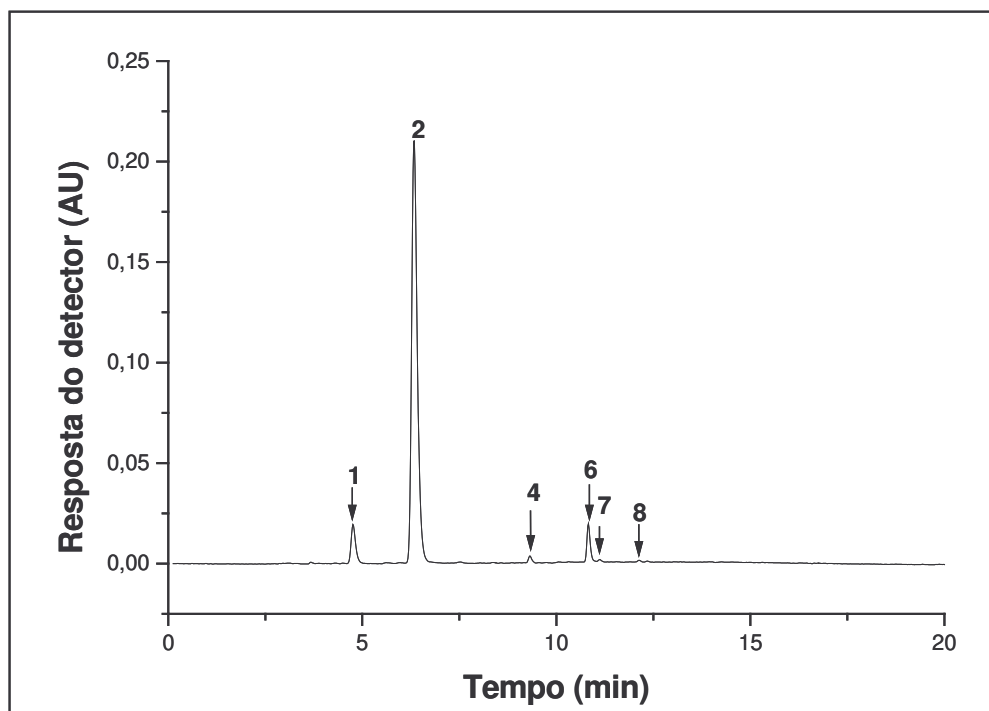


Figura 37. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto de antocianinas de frutos de camu-camu de Iguape. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Shim-Pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm); FM: gradiente de 4% ácido fosfórico aquoso/acetonitrila partindo de 85:15, atingindo 20:80 em 25 minutos e mantendo esta proporção no restante da corrida, vazão de 1 mL/min à 29°C. Processamento a 520 nm. A identidade dos picos está apresentada na Tabela 16.

Tabela 16. Características, obtidas por CLAE, das antocianinas de camu-camu.

No. do pico ^a	Antocianina	t _R (min)	λ _{max} (nm) ^c
1	delfinidina-3-glucosídeo	4.8	282, 340, 526
2	cianidina-3-glucosídeo	6.4	278, 326, 517
3	cyd ou pnd ^b	7.7	277, 380, 520
4	dpd ou ptd ou mvd ^b	9.4	277, 334, 528
5	cyd ou pnd ^b	10.1	280, 380, 523
6	dpd ou ptd ou mvd ^b	10.9	273, 322, 527
7	dpd ou ptd ou mvd ^b	11.2	281, 360, 528
8	pgd ^b	12.2	293, 378, 503
9	cyd ou pnd ^b	12.4	284, - , 521

^aNumerados de acordo com o cromatograma do extrato de camu-camu proveniente de Mirandópolis (Figura 36); ^bPossível identidade (cyd = cianidina, dpd = delfinidina, mvd = malvidina, ptd = petunidina, pnd = peonidina, pgd = pelargonidina); ^cGradiente de ácido fosfórico 4% e acetonitrila.

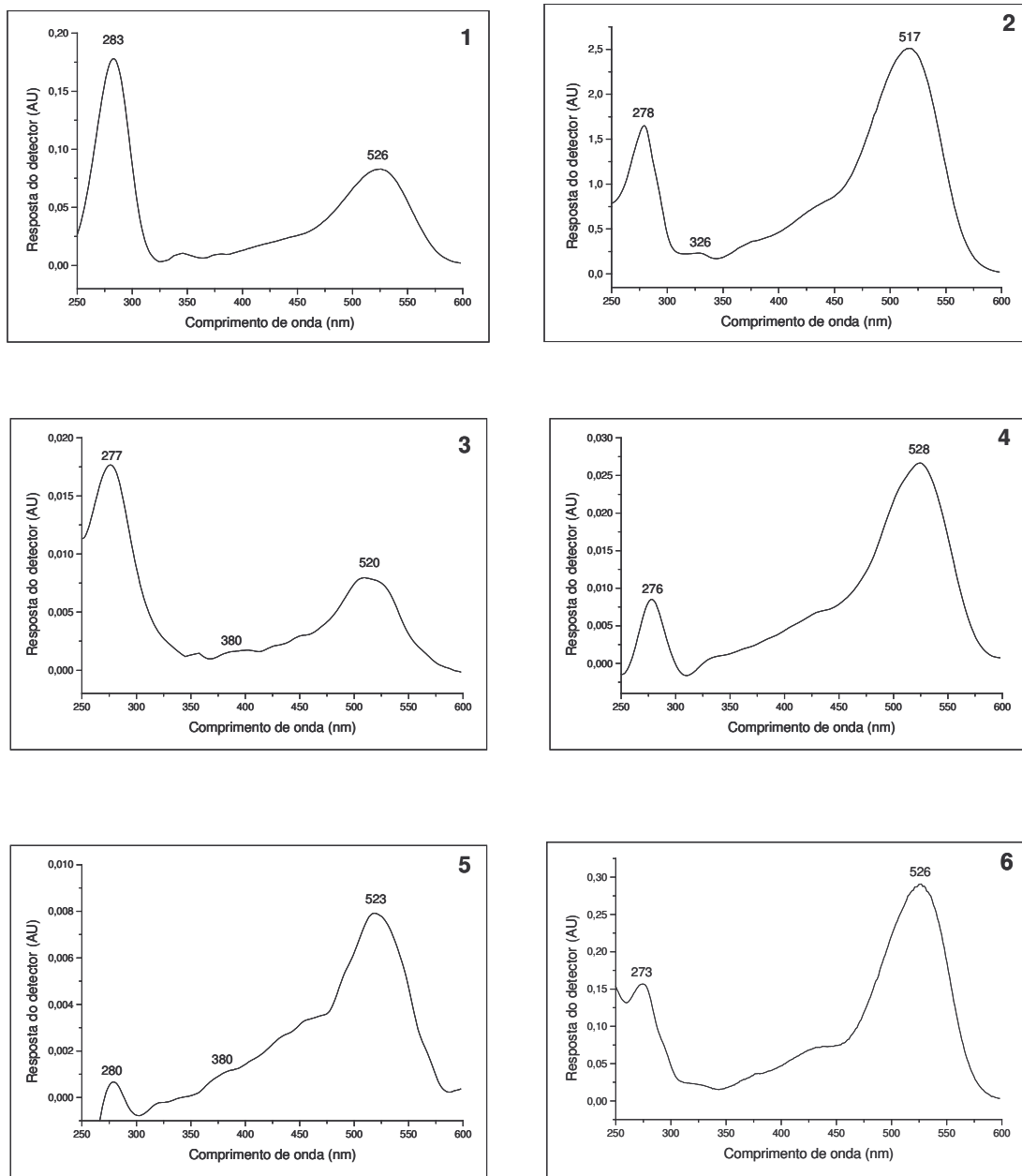


Figura 38. Espectros das antocianinas de camu-camu, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, numerados de acordo com a Tabela 16.

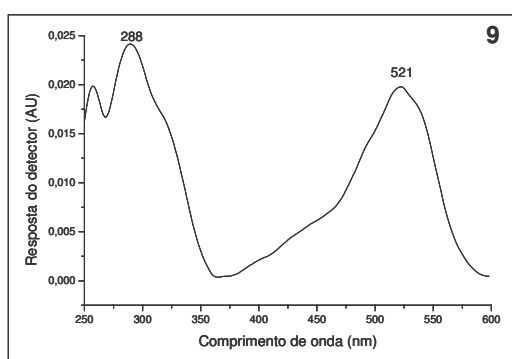
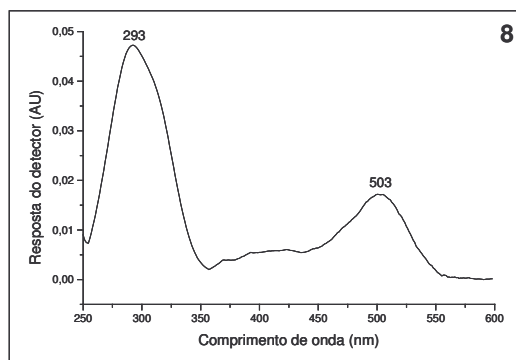
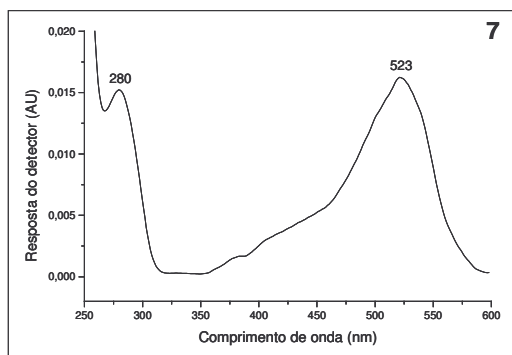


Figura 39. Espectros das antocianinas de camu-camu, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, numerados de acordo com a Tabela 16.

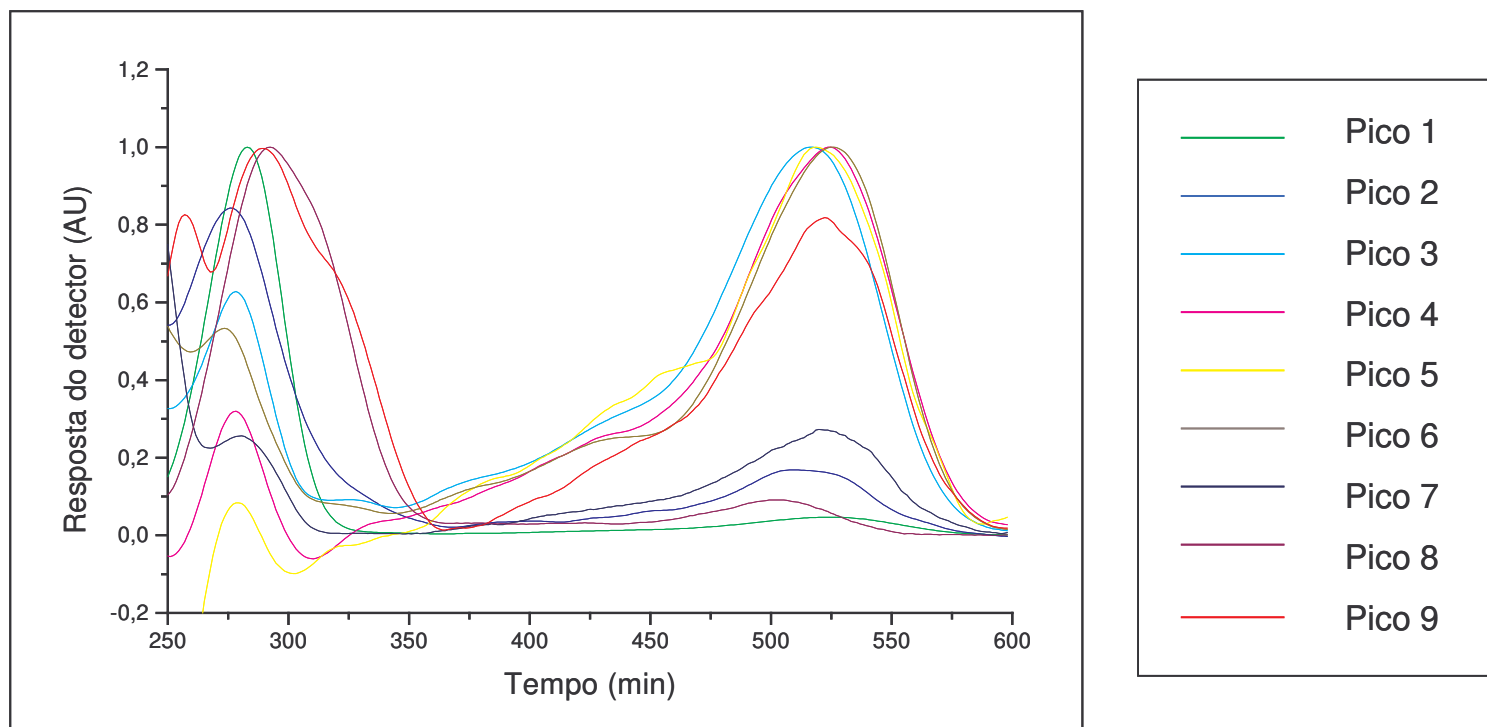


Figura 40. Espectros, obtidos pelo DAD, das antocianinas de camu-camu. Os números dos picos estão relacionados na Tabela 16 (Pág. 112).

Assim como no camu-camu, Hong & Wrolstad, (1990) também encontraram cianidina-3-glucosídeo como a antocianina majoritária em amoras. Outros trabalhos mostraram que esta também é a principal antocianina encontrada em elderberry (Bronnum-Hansen & Hansen, 1983), em ameixas (Vangorsel *et al.*, 1992), em uvas de mesa sem sementes (*Vitis* híbrida cv. Reliance) (Gao & Cahoon, 1995) e red currant (*Ribes rubrum* L.) (Maata *et al.*, 2003).

Estudos realizados para identificar as antocianinas de jabuticaba, fruta pertencente à mesma família do camu-camu, apresentaram algumas diferenças em relação ao pigmento principal encontrado, devido a análise de diferentes espécies. Enquanto Einbond *et al.*, (2004) encontraram cianidina-3-glucosídeo como a antocianina majoritária em *Myrciaria cauliflora*, Trevisan *et al.* (1972) encontraram peonidina-3-glucosídeo em *Myrciaria jabuticaba*, Berg.

5.3.2. Composição quantitativa

Para a quantificação das antocianinas do extrato total foi utilizado valor de absorvidade de 982 proposto por Fuleki & Francis (1968a) para a quantificação das antocianinas de cranberries. Como não há na literatura absorvidade para a cianidina-3-glucosídeo em etanol 95%/HCl 1,5 N (85:15), este valor não corresponde exatamente à absorvidade da mistura de pigmentos encontrada no camu-camu, no entanto, serve como indicativo da viabilidade da casca de camu-camu como fonte de antocianinas.

A casca de camu-camu apresentou concentração de $56,37 \pm 26,7$ mg/100 g para os frutos de camu-camu provenientes de Iguape e de $30,14 \pm 5,5$ mg/100 g para os frutos de Mirandópolis. Os teores de antocianinas totais de camu-camu não foram significativamente diferentes ($P=0,0866$) entre as distintas regiões.

Contudo, houve diferença significativa nos teores de antocianinas totais entre os diferentes lotes de uma mesma região. O camu-camu cultivado em

Iguape apresentou teor de antocianinas totais variando entre 20,6 e 90,47 mg/100g ($P=0,0008$), enquanto que para os frutos de Mirandópolis os teores variaram de 22,01 a 37,69 mg/100g, ($P=0,0072$). Esta variação nos níveis de antocianinas se deve, provavelmente, à diferença no estágio de maturação dos frutos.

Assim como nos carotenóides, a biossíntese das antocianinas também é influenciada por diversos fatores ambientais como luz, temperatura, além de fatores nutricionais, hormônios vegetais, danos mecânicos e ação patogênica. Entretanto, a luz se apresenta como o principal deles. Estudos sobre a atividade da luz na biossíntese de antocianinas em plantas mostraram que o fitocromo é o pigmento responsável por estimular o acúmulo de antocianinas (Mohr, 1972). Este pigmento é excitado pela exposição das plantas a raios infra-vermelho longo (720 nm) e nesta forma é capaz de aumentar consideravelmente a atividade de enzimas responsáveis pela síntese de antocianinas, promovendo conseqüentemente um aumento na concentração destes pigmentos nas plantas (Schopfer, 1977). Outros pesquisadores (Hahlbrock & Grisebach, 1979; Wellmann, 1975) relataram que muitas outras enzimas pertencentes a biossíntese de flavonóides (precursores das antocianinas) também têm sua atividade induzida pela luz.

A temperatura também é um fator de extrema importância na biossíntese de antocianinas. Sabe-se que em climas temperados, é comum um acúmulo destes pigmentos no início do inverno. Além disso, diversos estudos realizados relataram um aumento na concentração de antocianinas em espécies cultivadas à baixas temperaturas. A influência da água também foi estudada, e observou-se uma queda nos teores de antocianinas, em plantas expostas à irrigação intermitente (Mclure, 1975).

Levando em consideração os fatos relatados acima, acredita-se que as temperaturas mais amenas da região de Iguape, no período de colheita (Figuras 22 e 23 item 7.1.4.2.), sejam as principais responsáveis pelos teores superiores

apresentados pelos frutos provenientes desta cidade. Entretanto, não são as únicas, pois estes fatores não atuam isoladamente.

Wrolstad *et al.*, (2001) também observaram um aumento considerável nas concentrações de antocianinas de rabanetes produzidos no inverno (12,2 a 53,0 mg/100g) em relação aos produzidos durante primavera (4,7 a 38,8 mg/100g).

Durante a análise de framboesa em diferentes estádios de maturação, Boyles & Wrolstad (1993) também observaram grandes variações nos teores de antocianinas totais. Os frutos verdes apresentaram concentrações de 116 mg/L enquanto que os frutos totalmente maduros atingiram teores iguais a 1101 mg/L.

Apesar das amostras de Mirandópolis apresentarem concentração total de antocianinas, em mg/100 g de cascas, inferior às obtidas para as amostras de Iguape, a proporção entre os pigmentos majoritários e minoritários foi semelhante para ambas as regiões, como pode ser observado na Tabela 17.

Embora o camu-camu não apresente teores de antocianinas totais tão elevados quanto aos encontrados em frutas como o açaí (Bobbio *et al.*, 2000), e a uva Seibel 2 (Oliveira, 2001) que apresentaram concentrações de antocianinas totais equivalentes a 263 mg/100 g e 500,5 mg/100 g de cascas, respectivamente. Esta fruta pode ser considerada uma boa fonte de cianidina-3-glucosídeo, pois apenas o pêssego (*Prunus pérsica* L.) apresentou concentração relativa de cianidina-3-glucosídeo comparável (90%) (Gross, 1987) à observada em frutos de camu-camu (88%).

Tabela 17. Composição relativa das antocianinas de camu-camu, obtidas por CLAE, e expressas como porcentagem de área do total.

Nº do Pico ^a	Antocianina	tr (min)	Concentração (% de área) ^b	
			Iguape	Mirandópolis
1	delfinidina-3-glucosídeo	4,8	4,2 ± 1,5	5,1 ± 1,0
2	cianidina-3-glucosídeo	6,4	88,8 ± 1,7	87,0 ± 1,0
3	cyd ou pnd ^c	7,6	nd	0,2 ± 0,2
4	dpd ou ptd ou mvd ^c	9,4	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3
5	cyd ou pnd ^c	10,1	nd	0,1 ± 0,1
6	dpd ou ptd ou mvd ^c	10,9	5,6 ± 0,5	5,4 ± 0,1
7	dpd ou ptd ou mvd ^c	11,1	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1
8	pgd ^c	12,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2
9	cyd ou pnd ^c	12,4	nd	0,4 ± 0,1

^aNumerados de acordo com as Figuras 36 e 37.

^bMédia e desvio padrão de três lotes em duplicata.

^cPossível identidade (cyd = cianidina, dpd = delfinidina, mvd = malvidina, ptd = petunidina, pnd = peonidina, pgd = pelargonidina); nd: não detectado.

6. CONCLUSÕES

1. A análise do extrato bruto de carotenóides de camu-camu por CCD e por CLAE, em colunas de fase reversa C₁₈ e C₃₀, resultou na separação de 46 carotenóides no total. Sendo que a coluna de fase reversa C₃₀ proporcionou melhor separação de isômeros quando comparada à C₁₈.

2. Combinando as informações obtidas pela CLAE-DAD (tempo de retenção, cromatografia e espectro de absorção UV/Visível), o comportamento cromatográfico em CCD, bem como as reações químicas específicas, 43 carotenóides foram identificados. São eles: neoxantina, *cis*-neoxantina, neocromo, 9-*cis*-violaxantina, violaxantina, luteoxantina, 5,6,5',6'-diepóxi-luteína, taraxantina (5,6-epóxi-luteína), mutatoxantina (5,8-epóxi-zeaxantina), anteraxantina (5,6-epóxi-zeaxantina), 9-*cis*-luteína, luteína, 13-*cis*-luteína, zeaxantina, *cis*-5,6,5',6'-diepóxi-β-criptoxantina, 5,6,5',6'-diepóxi-β-criptoxantina, criptoflavina (5,8-epóxi-β-criptoxantina), 5,6-epóxi-β-criptoxantina, *cis*-rubixantina, rubixantina, apo-β-10'-carotenal, syntaxantina, citranaxantina, zeínoxantina, β-criptoxantina, 9-*cis*-β-criptoxantina, 5,6,5',6'-diepóxi-β-caroteno, mutacromo (5,8-epóxi-β-caroteno), 5,6-epóxi-β-caroteno, β-zeacaroteno, prolicopeno, ε-caroteno, *cis*-ζ-caroteno, ζ-caroteno, α-caroteno, *cis*-γ-caroteno, γ-caroteno, fitoflueno, β-caroteno, 9-*cis*-β-caroteno, 9-*cis*-licopeno e licopeno. Contudo, três carotenóides minoritários não foram identificados.

3. A *all-trans*-luteína foi o carotenóide principal encontrado nos frutos de camu-camu, para ambas as regiões, apresentando concentrações equivalentes a 160,5 ± 93,1 μg/100g nos frutos de Iguape e 601,9 ± 75,6 μg/100g nos frutos de Mirandópolis. Em seguida apareceram o β-caroteno (72,8 ± 60,9 μg/100g e 142,3 ± 19,4 μg/100g para o camu-camu de Iguape e Mirandópolis, respectivamente), violaxantina e luteoxantina.

4. Os teores de carotenóides totais encontrados nos frutos de Mirandópolis (1096,4 ± 198,0 μg/100g) foram significativamente superiores aos observados no

camu-camu produzido em Iguape ($363,4 \pm 217,4 \mu\text{g}/100\text{g}$). A variação quantitativa mais nítida se deu nas concentrações de luteína e β -caroteno. O conteúdo de luteína no camu-camu de Mirandópolis foi 3,7 vezes superior ao encontrado nos frutos de Iguape e para o β -caroteno este valor superou 1,9 vezes.

5. Também foram constatadas variações significativas nos teores de carotenóides majoritários e minoritários entre os lotes de uma mesma região.

6. A análise do extrato bruto de antocianinas de camu-camu por CLAE proporcionou a separação de nove antocianinas para as amostras provenientes de Mirandópolis e de apenas seis delas para as amostras provenientes de Iguape.

7. A cianidina-3-glucosídeo e a delphinidina-3-glucosídeo foram conclusivamente identificadas utilizando um conjunto de informações obtidas pelo CLAE-DAD, CLAE-EM e RMN de ^1H .

8. O teor de antocianinas de frutos de camu-camu cultivados em Iguape ($56,4 \pm 26,7 \text{ mg}/100\text{g}$) foi superior ao observado nos frutos de Mirandópolis ($30,1 \pm 5,5 \text{ mg}/100\text{g}$), porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, entre os lotes de uma mesma região, foi observada variação significativa nos níveis de antocianinas.

9. A composição relativa de antocianinas, obtida por CLAE, apontou cianidina-3-glucosídeo como antocianina majoritária, perfazendo 88% do total, para ambas as regiões. Em seguida, aparece a delphinidina-3-glucosídeo que contribuiu com 4% do total de antocianinas nos frutos de Iguape e com 5% do total no camu-camu procedente de Mirandópolis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCOS, B.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G. & CANO, M. P. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 873-879, 2000.
- ANDERSEN, O. M.; AKSNES, D. W.; NERDAL, W. & JOHANSEN, O. P. structural elucidation of cyanidin-3-sambubioside and assignments of the ^1H and ^{13}C NMR resonances through two-dimensional shift correlated NMR techniques. *Phytochem. Anal.*, 2: 175-183, 1991.
- ANDO, T.; TATSUZAWA, F.; SAITO, N.; TAKAHASHI, M.; TSUNASHIMA, Y.; NUMAJIRI, H.; WATANABE, H.; KOKUBUN, H.; HARA, R.; SEKI, H. & HASHIMOTO, G. Differences in the floral anthocyanin content of red petunias and *Petunia exserta*. *Phytochem.* 54: 495-501, 2000.
- ANDRADE, J.S. Curvas de maturação e características nutricionais do camu-camu *Myrciaria dúbia* (H.B.K.) Mc Vaugh cultivado em terra firme na Amazônia Central Brasileira. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 154 p,1991.
- ASSUNÇÃO, R. B. & MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chem.* 81: 495-502, 2003.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food Comp. Anal.*, 17: 385-396, 2004.
- BAKKER, J. & TIMBERLAKE, C. F. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 35-43, 1997.
- BALDI, A.; ROMANI, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; CASETTA, B. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2104-2109, 1995.
- BAUBLIS, A. J., SPOMER, A. & BERBER-JIMÉNEZ, M. D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.*, 59: 1219-1221, 1994.

- BAUBLIS, A. J. & BERBER-JIMÉNEZ, M. D. Structural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida*. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 640-646, 1995.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Anthocyanins of the brazilian fruit *Cyphomandra betaceae*. *Food Chem.* 12: 189-195, 1983.
- BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A. & FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 20: 388-390, 2000.
- BONE, R. A.; LANDRUM, J. T.; GUERRA, L. H. & RUIZ, C. A. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in human. *J. Nutr.* 133, 992-998, 2003.
- BOYLES, M. J. & WROLSTAD, R. E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and enviromental factors. *J. Food Sci.* 58: 1135-1141, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Camu-camu, a nova mania entre as frutas brasileiras. Disponível em <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 06/11/2002.
- BREIPHTHAUPT, D. E. & SCHWACH, W. determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. *Eur. Food. Res. Technol.* 211: 52-55, 2000.
- BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In: "Carotenoids", vol 1B, G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 13-62, 1995.
- BRITTON, G. Overview of Carotenoid Biosynthesis. In: "Carotenoids", vol 3, G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 116-146, 1998
- BRONNUM-HANSEN, K. & HANSEN, S. High performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *J. Chromatogr.* 262, 385-392, 1983.
- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: "Anthocyanins as food colors". P. Markakis (Ed). Academic Press Inc. p. 1-39, 1982.

- BROUILLARD, R. Flavonoids and flower color. In: "The Flavonoids: Advances in research since 1980." J. B. Harborne (Ed), Chapman & Hall Ltd, New York. p. 525-538, 1988.
- BRUNNER, M. R. Thermische (E/Z)-Isomerisierung von carotinoiden. Inauguraldissertation der Philosophisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern. 135 p., 1997.
- BUSHWAY, R. J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 8: 1527-1547, 1985.
- CANO, M. P. & MARÍN, M. A. Pigment composition and color of frozen and canned kiwi fruit slices. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2141-2146, 1992.
- CANO, M. P. & DE ANCOS, B. Carotenoid and carotenoid ester composition in mango fruit as influenced by processing method. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2737-2742, 1994.
- CANO, M. P.; DE ANCOS, B.; LOBO, M. G. & MONREAL, M. Carotenoid pigments and colour of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* L) cv sunrise during post-harvest ripening *J. Agric. Food Chem.* 71: 351-358, 1996.
- CARREÑO, J.; ALMELA, L.; MARTÍNEZ, A. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. *Lebens. Wissen. Technol.* 30:259-265,1997.
- CAVALCANTE, M.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: "Food Science and Human Nutrition". G. Charalambous (Ed.). *Elsevier Sci. Publ.* Amsterdam. p. 643-650, 1992.
- CECCHI, H. M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *J. Food Sci.* 46:147-149, 1981.
- CHAOVANALIKIT A. & WROLSTAD, R. E. Anthocyanins and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *J. Food Sci.* 69: FCT73-FCT83, 2004.

- CHEN, B. H.; PENG, H. Y. & CHEN, H. E. Changes of Carotenoids, Color, and Vitamin A Contents during Processing of Carrot Juice. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1912-1918, 1995.
- CHEN, H.E.; PENG, H.Y. & CHEN, B.H. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice *Food Chem.* 57: 497-503, 1996.
- CLEMENT, C. R. & DA SILVA, D. F. Amazonian small fruit with commercial potential. *Fruit Varieties J.* 48: 152-158, 1994.
- CRAFT, N. E.; SANDER, L. C. & PIERSON, H. F. Separations and relative distribution of all-*trans*- β -caroteno and *cis* isomers in β -caroteno preparations. *J. Micronutr. Anal.* 8: 209-221, 1990.
- CURL, A. L. The carotenoids of several low-carotenoid fruits. *J. Food Sci.* 29: 241-245, 1964.
- DAVIES, B.H. Carotenoids. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". T.W. Goodwin (Ed.), vol 2. Academic Press, London. p. 38-165, 1976.
- DEGENHARDT, A.; KNAPP H. & WINTERHALTER, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 338-343, 2000.
- DONNER, H.; GAO, L. & MAZZA, G. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Res. Intern.* 30: 637-643, 1997.
- DUSSI, M. C.; SUGAR, D. & WROLSTAD, R. E. Characterizing and quantifying anthocyanins in red pears and the effect of light quality on fruit color. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120: 785-789, 1995.
- EINBOND, L. S., REYNERTSON, K. A., LUO, X., BASILE, M. J. & KENNELLY E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem.* 84: 23-28, 2004.
- EMENHISER, C.; SANDER, L.C. & SCHWARTZ, S.J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 707: 205-216, 1995.
- EMENHISER, C.; SIMUNOVIC, N.; SANDER, L.C. & SCHWARTZ, S.J. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C₃₀

- column in reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3887-3893, 1996.
- EPLER, K. S.; SANDER, L. C.; ZIEGLER, R. G.; WISE, A. S. & CRAFT, N. E. Evaluation of reversed-phase liquid chromatography columns for recovery and selected carotenoids. *J. Chromatogr.* 595: 89-101, 1992.
- EUGSTER, C.H. Chemical Derivatization: Microscale Tests for the Presence of Common Functional Groups in Carotenoids. In: "Carotenoids, vol 1B: Spectroscopy". G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 71-80, 1995.
- FARIN, D.; IKAN, R. & GROSS J. The carotenoids in the juice and flavedo of mandarin hybrid (*C. reticulata*) cv. Michal during ripening. *Phytochem.* 22: 403-408, 1983.
- FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: "Anthocyanins as food colors". P. Markakis (Ed). Academic Press Inc. p. 182-205, 1982.
- FRANCO, M. R. B. & SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some brazilian fruits: umbu-cajá (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *J. Agric. Food Chem.* 48: 1263-1265, 2000.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J. Food Sci.* 33: 72-77, 1968a.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 4. Determination of individual anthocyanins in cranberry and cranberry products. *J. Food Sci.* 33: 471-478, 1968b.
- GAO, L. & MAZZA, G. Characterization, quantitation and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *J. Agric. Food Chem.* 43: 343-346, 1995.
- GAO, Y. & CAHOON, G. A. High performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the red seedless table grape Reliance. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 339-345, 1995.

- GARCIA-VIGUEIRA, C.; ZAFRILLA, P. & TOMÁS BARBERÁN. Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *J. Sci Food Agric.* 73: 207-213, 1997.
- GARCIA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ROMERO, F.; ABELLAN, P.; ARTES, F. & TOMAS-BARBERAN, F. A. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *J. Food Sci.* 64: 243-247, 1999.
- GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M. & KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4581-4589, 2000.
- GIUSTI, M. M.;GHANADAN, H.. & WROLSTAD, R. E. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4858-4863, 1998.
- GIUSTI, M. M.; RODRÍGUEZ-SAONA, L. E.; GRIFFIN, D. & WROLSTAD, R. E. Eletrospray and tandem mass-spectrometry as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4657-4664, 1999.
- GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the structure of papaya β -cryptoxanthin monoepoxide. *Food Chem.* 36: 281-286, 1990.
- GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis isomers of provitamins A in Brazilian vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3081-3086, 1998.
- GONZÁLEZ, S.; ASTNER, S.; AN, W.; GOUKASSIAN, D. & PATHAK, M. A. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyper proliferation and acute inflammation in hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* 121, 399-405, 2003.
- GOODWIN, T. W., "The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1, Plants", Chapman and Hall, London, 1980.
- GOTO, T. Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 52: 113-158, 1987.

- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B. & Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.* 90: 487-502, 2003.
- GROSS, J. Changes of chlorophylls and carotenoids in developing strawberry fruits (*Fragaria ananassa*) cv. Tenira. *Gartenbauwiss.* 47: 142-144, 1982.
- GROSS, J. Chlorophyll and carotenoid pigments in *Ribes* fruits. *Sci Hortic.* 18: 131-136, 1982/83.
- GROSS, J. Carotenoid pigments in three plum cultivars. *Gartenbauwiss.* 49: 18-21, 1984.
- GROSS, J. Carotenoid pigments in the developing cherry (*Prunus avium*) cv. 'Dönissen's Gelbe'. *Gartenbauwiss.* 50: 88-90, 1985.
- GROSS, J. Pigments in Fruits. Academic Press, London. p. 59-258, 1987.
- HAHLBROCK, K. & GRISEBACH, H. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 105-130, 1979.
- HAMANO, P. S. & MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). *J. Food Comp. Anal.* 14: 335-343, 2001.
- HARBORNE, J. B. The Anthocyanins Pigments. In: "Comparative Biochemistry of the Flavonoids". Academic Press, London and New York. p. 1-36, 1967.
- HARBORNE, J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. In: "Recent advances in Phytochemistry, vol 12: Biochemistry of Plant Phenolics". T. Swain; J. B. Harborne; C. F. Van Sumere (Ed). Plenum Press, New York, 1979.
- HARBORNE, J. B. & GRAYER, R. J., The anthocyanins. In: "The Flavonoids." J. B. Harborne (Ed), Chapman & Hall Ltd, London. p. 1-20, 1986.
- HARBORNE, J. B. & GRAYER, R. J., Advances in research since 1980. In: "The Flavonoids." J. B. Harborne (Ed), Chapman & Hall Ltd, New York. p. 1-20, 1988.
- HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*. p.632-652, 1998

- HEINONEN, M. I.; MEYER, A. S. & FRANKEL E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4107-4112, 1998.
- HIRSCHBERG, J. Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis. In: "Carotenoids", vol 3, G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 178-194, 1998
- HONG, V. & WROLSTAD, R. E. Characterization of anthocyanin containing colorants and fruit juices by HPLC/Photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.* 38: 689-708, 1990.
- IACOBUCCI, G. A. & SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylium salts. *Tetrahedron.* 39: 279-308, 1983.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA). Cultivo do camu-camu. Disponível em <<http://tamandua.inpa.gov.br/cpca/areas/camu-camu.html>>. Acesso em: 08/05/2000.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA). Domesticação de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para uso em agroindústria na Amazônia. Disponível em <<http://tamandua.inpa.gov.br/cpca/kaoru/kaoru-proj.html>>. Acesso em: 10/05/2000.
- ISLER, O. In: "Carotenoids". Chemical Research Department Hoffmann-La Roche & Co. Ltd; Basle, Switzerland – Birkhäuser Verlag Basel and Stuttgart. p. 30 e 198, 1971.
- JOHN, J.; SUBBARAYAN, C. & CAMA, H. R. Carotenoids in 3 stages of ripening of mango. *J. Food Sci.* 35: 262-265, 1970.
- JOSHIPURA, K. J.; HU, F. B.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E. B.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G.; ASCHERIO, A.; ROSNER B.; SPIEGELMAN, D. & WILLETT, W. C. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 132: 1106-1114, 2001.
- JUSTI, K. C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N. E. & MATSUSHITA M. Nutritional composition and Vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch Latinoam Nutr.* 50: 405-408, 2000.

- KAMEI, H.; KOJIMA, T.; KOIDE, T.; UMEDA, T.; YUKAWA, T. & TERABE, K. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest.* 13: 590-594, 1995.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G. R. & WHITAKER, N. F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 603-616, 1986.
- KHACHIK, F. & BEECHER, G. R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty-acids esters in some squash products by liquid chromatography. 1. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 36: 929-937, 1988.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; VANDERSLICE, J. T. & FURROW, G. Liquid chromatographic artifacts and peak distortion: sample solvents interactions in the separation of carotenoids. *Anal. Chem.* 60: 807-811, 1989.
- KIM, J. H.; NONAKA, G. I.; FUJIEDA, K. & UEMOTO, S. Anthocyanidin malonylglucosides in flowers of *Hibiscus syriacus*. *Phytochem.* 28: 1503-1506, 1989.
- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & GODOY, H. T. Assessments of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and pro-vitamins A. *Food Chem.* 35: 187- 195, 1990.
- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & YOKOYAMA, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebens. Wissen. Technol.* 24: 415-418, 1991.
- KIMURA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Sources of errors in the quantitative analysis of food carotenoids by HPLC. *Arch. Latino Am. Nutr.* 49: 58-66, 1999.
- KONNING, E. J. M. & ROOMANS. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruits. *Food Chem.* 59: 599-603, 1997.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* 66: 1003-1010, 1994.

- KULL, D. & PFANDER, H. List of New Carotenoids. In: "Carotenoids, vol 1A: Analysis of Carotenoids". G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 295-318, 1995.
- LEE, H. S. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed Budd Blood orange (*Citrus sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 50: 1243-1246, 2002.
- LESELLIER, E.; MARTY, C.; BERSET, C. & TCHAPLA, A. Optimization of the isocratic non-aqueous reversed –phase (NARP) HPLC separation of trans/cis- α - and β -carotenes. *J. High Res. Chromatogr.* 12: 447-454, 1989.
- LEWIS, C. E.; WALKER, J. R. L.; LANCASTER, J. E. & SUTTON, K, H. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food. Agric.* 77: 45-57, 1998.
- LIETTI, A.; CRISTONI, A. & PICCI, M. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and anti-inflammatory activity. *Arzneimittel-Forschung.* 26: 829-832, 1976.
- MAATTA, K. R.; KAMAL-ELDIN, A. & TORRONEN, A. R. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6736-6744, 2003.
- MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O. & AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intramolecular and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 170-176, 2001.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: "Anthocyanins as food colors". P. Markakis (Ed). Academic Press Inc. p.163-178, 1982.
- MARKHAM, K. R. In:"Techniques of Flavonoid Identification". Academic Press Inc. London, 112 p., 1982
- MATEUS, N.; SILVA, A. M. S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. & DE FREITAS, V. Identification of anthocyanin-flavonol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2110-2116. 2002.

- MAZZA, G. & BROUILLARD, R. Recent developments in stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* 24: 207-225, 1987.
- MAZZA, G. & BROUILLARD, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem.* 29: 1097, 1990.
- MAZZA, R. & MINIATI, E. In: "Anthocyanins in fruits, vegetables and grains". CRC Press Inc USA. p.1-28, 1993.
- McLURE, J. W. Physiology and functions of flavonoids. In: "The Flavonoids." Part 1. J. B. Harborne, T. J. Marby, H. Marby (Eds), Academic Press, New York. Chapter 18, 1975.
- MERCADANTE, A. Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1094-1097, 1991.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; PFANDER, H. & BRITTON, G. Isolation of methyl 9'-cis-apo-6'-licopenoate from *Bixa orellana* L. *Phytochem.* 41: 1201-1203, 1996.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A. & PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1050-1054, 1997a.
- MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B & BRITTON, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food Chem.* 45: 120-123, 1997b.
- MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food. Chem.* 46: 4102-4106, 1998.
- MERCADANTE, A. Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *J. Agric. Food Chem.* 46: 128-130, 1998.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A. & PFANDER, H. Carotenoids from guava: isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.* 47: 145-151, 1999.
- MERCADANTE, A. Z. Chromatographic separation of carotenoids. *Arch. Latino Am. Nutr.* 49: 52S-57S, 1999.

- MERCADANTE, A. Z. & EGELAND, E. S. In: "Carotenoids - Handbook". G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. 563 p., 2004.
- MERKEN, H. M. & BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* 48: 577-599, 2000.
- MOHR, H. "Lectures on photomorphogenesis." Springer Verlag, Berlin and New York, 1972.
- MORAZZONI, P. & MAGISTRETTI M. J. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue. *Fitoterapia.* 57: 11-14, 1986.
- MOULY, P.P.; GAYDOU, E. M.; LAPIERRE, L. & CORSETTI, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4038-4045, 1999.
- NIELSEN, I. L. F.; HAREN, G. R.; MAGNUSSEN, E. L. DRAGSTED, L. O. & RASMUSSEN, S. E. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5861-5866, 2003.
- NUNES, I. L. & MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciênc. Tecnol. de Aliment.* 24: set., 2004. (dados aceitos para publicação).
- OLIVEIRA, C.; FERREIRA, A. C. S.; PINTO, M. M.; HOGG, T.; ALVES, F. & DE PINHO, P. G. Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5967-5971, 2003.
- OLIVEIRA, P. A.. Estudo da estabilidade e estabilização do bagaço de uva Seibel 2. Campinas. Tese de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2001.
- OLIVER, J.; PALOU, A. & PONS, A. Semi quantification of carotenoids by high performance liquid chromatography: saponification-induced losses in fatty foods. *J. Chromatogr. A* 829: 393-399, 1998.

- OLIVER, J. & PALOU, A. Chromatographic separation of carotenoids in foods – Review. *J. Chromatogr. A*. 881: 543-555, 2000.
- OSAWA, Y. Co-pigmentation of anthocyanins. In: "Anthocyanins as food colors". P. Markakis (Ed). Academic Press Inc. p.41-65, 1982.
- PADULA, M & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas. *Food Chem.* 20: 11-19, 1986.
- PEDERSEN, A. T.; ANDERSEN, O. M.; AKSNES, D. W. & NERDAL, W. NMR of anthocyanidins: assignments and effects of exchanging aromatic protons. *Magn. Reson. Chem.* 31: 972-976, 1993.
- PHILLIP, D.; MOLNAR, P.; TOTH, G. & YOUNG, A. J. Light-induced formation of 13-*cis*-violaxanthin in leaves of *Hordeum vulgare*. *J. Photochem. Photobiol. B*. 49: 89-95, 1999.
- PROCTOR, J. T. A. & CREASY, L. L. The anthocyanin of the mango fruit. *Phytochem.* 8: 2108, 1969.
- QUACKENBUSH, F. W. & SMALLIDGE, R. L. Nonaqueous reverse phase liquid chromatography system for separation and quantitation of provitamin A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 767-772, 1986.
- RAZUNGLES, A. J.; BABIC, I.; SAPIS, J. C. & BAYONOVE, C. L. Particular behavior of epoxy xanthophylls during veraison and maturation of grape. *J. Agric. Food. Chem.* 44: 3821-3825, 1996.
- REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSE, M. L. & BELTRÁN S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* 847: 83-90, 1999.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. Carotenoid composition and vitamin A value of the brazilian fruit *Cyphomandra betaceae*. *Food Chem.* 12: 61-65, 1983.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in food. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. 64p., 2001.

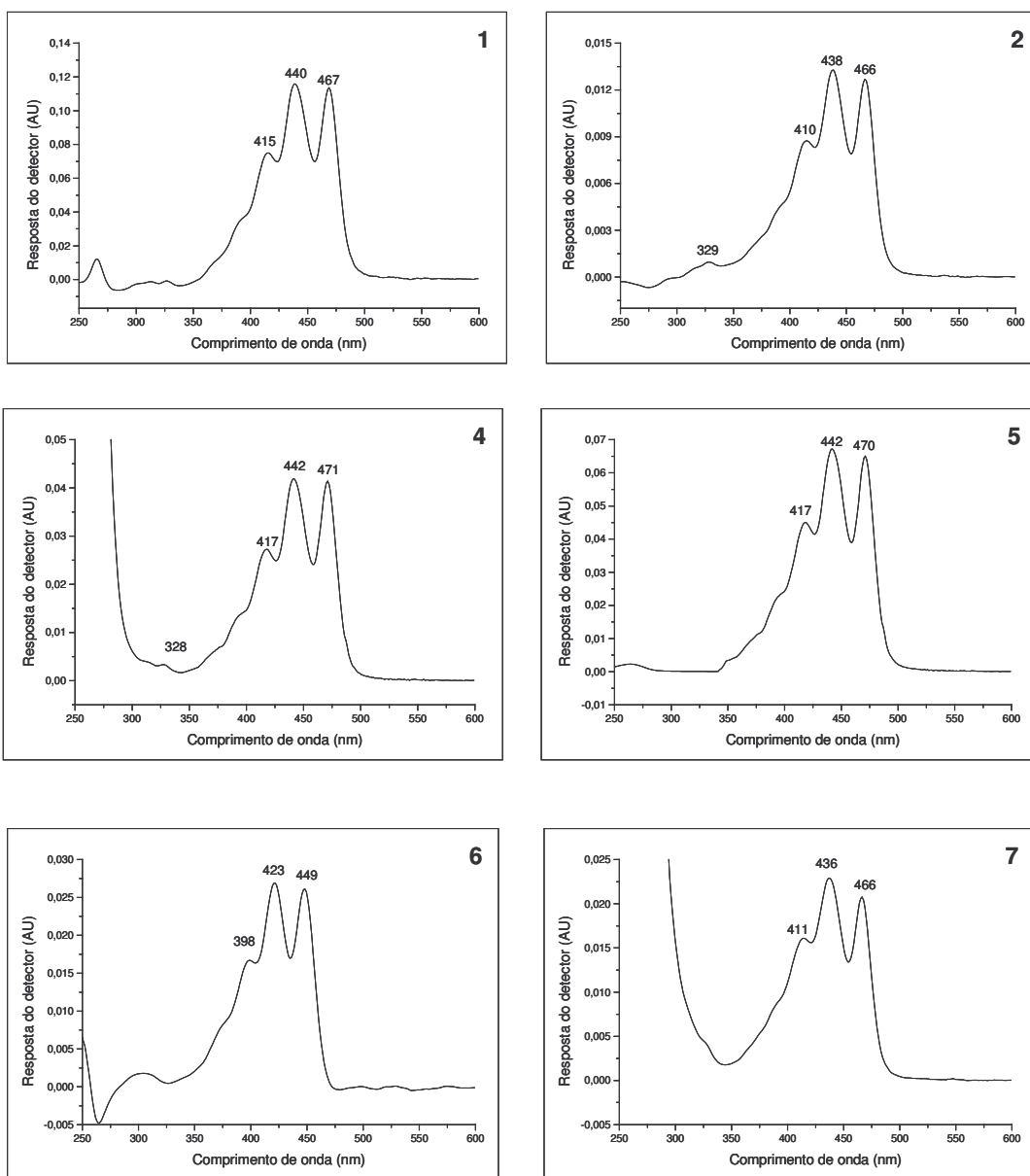
- RODRÍGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M. & WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *J. Food Sci.* 63:458-465, 1998.
- ROQUE, P. O camu-camu. *Manchete Rural.* 88:47-47, 1994.
- ROUSEFF, R.; SADLER, G. D.; PUTNAM, T. J. & DAVIS, J. E. Determination of β -caroteno and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2176-2181, 1992.
- SAITO, N.; KU, M.; TATSUZAWA, F.; LU, T. S.; YOKOI, M.; SHIGIHARA, A. & HONDA, T. Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*. *Phytochem.* 40: 1521-1529, 1995.
- SANCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B. & CANO, M. P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* 51: 647-653, 2003.
- SANDER, L. C.; EPLER-SHARPLESS, K.; CRAFT, N. E. & WISE, S. A. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.* 66: 1667, 1994.
- SANT'ANA, H. M. P.; STRINGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C. & AZEREDO, R. M. C. Carotenoid retention and vitamin A in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem.* 61: 145-151, 1998.
- SARNI-MANCHADO, P.; LE ROUX, E.; LE GUERNEVÉ, C.; LOZANO, Y. & CHEYNIER, V. Phenolic composition of litchi fruit pericarp. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5995-6002, 2000.
- SCHEIDT, K. & LIAAEN-JENSEN, S. Isolation and Analysis. In: "Carotenoids" vol 1A. G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (Eds.). Birkhauser, Basel. p. 81-108, 1995.
- SCHOPFER, P. Phytochrome control of enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 223-252, 1977.
- SIAN, N. K. & ISHAK, S. Carotenoid and anthocyanins contents of papaya and pineapple: influence of blanching and predrying treatments. *Food Chem.* 39: 175-185, 1991.

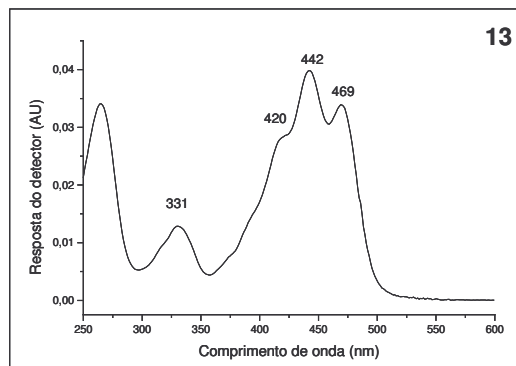
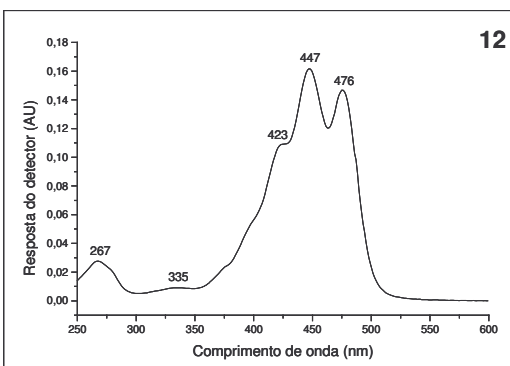
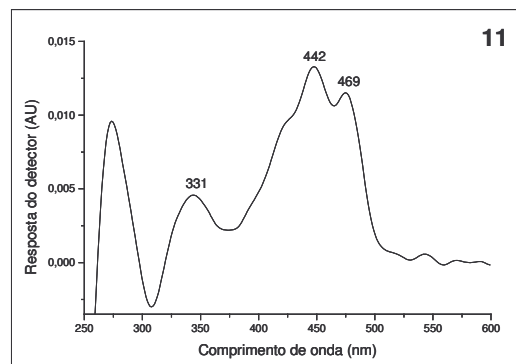
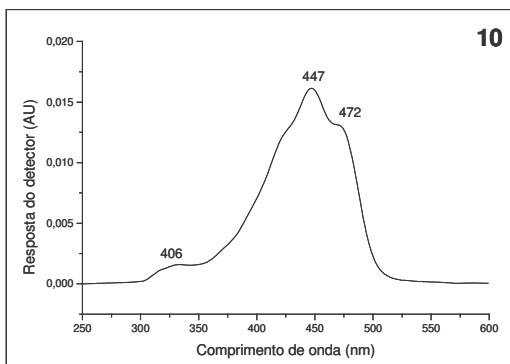
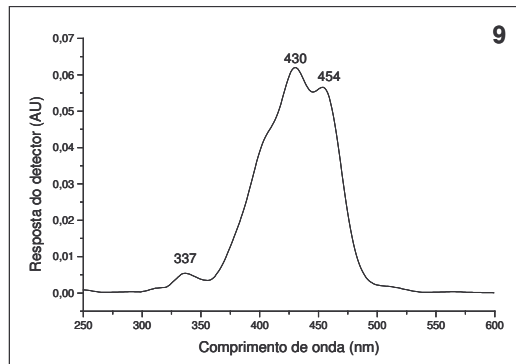
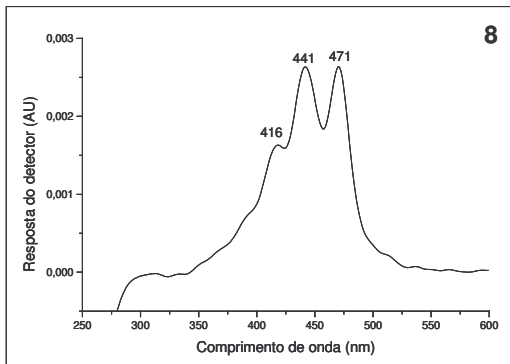
- SILVA, S. R. & MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa) in natura. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 22: 254-258, 2002a.
- SILVA, S. R. & MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides em polpa congelada de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002b (disponível em CD).
- SIMPSON, K. L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 7, 1983.
- SLIMESTAD, R. & SOLHEIM, H. Anthocyanins from black currant (*Ribes nigrum* L.) *J. Agric. Food Chem.* 50: 3228-3231, 2002.
- STRACK, D. & WRAY, V. Anthocyanins, In: "Methods in plant biochemistry". P.M Dey, J. B. Harborne (Eds.), Academic Press, New York, p. 325-356, 1989.
- STRAUB, O. Key to Carotenoids. H. Pfander (Ed.). Birkhauser Verlag, Basel. 295 p., 1987.
- TAMURA H. & YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agric. Food. Chem.* 42: 1612-1615, 1994.
- TAN, X. P.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y. & CHACHIN, K. Changes in pigments in pulp and aril of Balsam pear (*Momordica charantia* L.) fruit during development and storage. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 68: 683-688, 1999.
- TIMBERLAKE, C. F. & BRIDLE, P. Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature.* 212: 158-159, 1966.
- TREVISAN, L. M., BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. Carbohydrates, organic acids and anthocyanins of *Myrciaria jabuticaba*, Berg. *J. Food Sci.* 37: 818-819, 1972.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; USHIDA, K.; AOKI, H. & OSAWA, T. Dietary cyanidin-3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.* 133: 2125-2130, 2003.
- TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T. & KOYAMA, Y. Separation and identification of *cis/trans*-carotenes by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 245: 559-564, 1982.

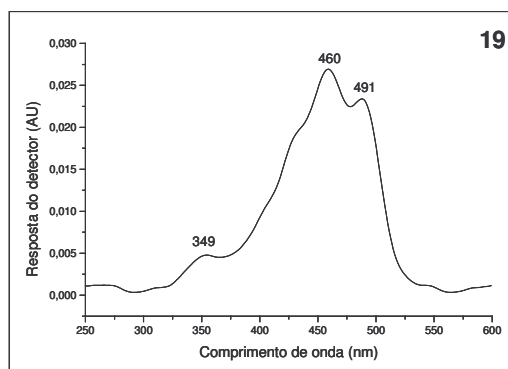
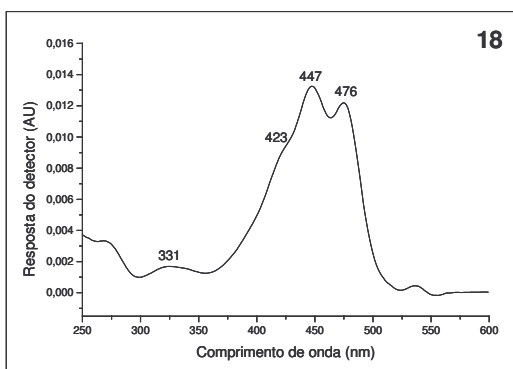
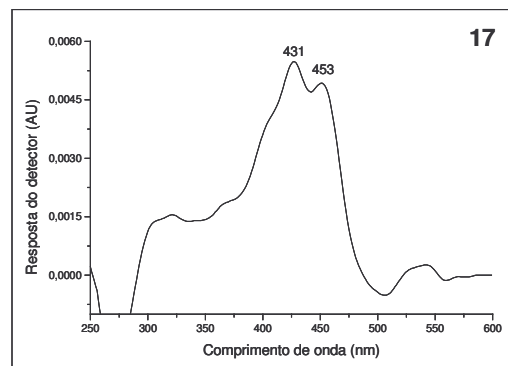
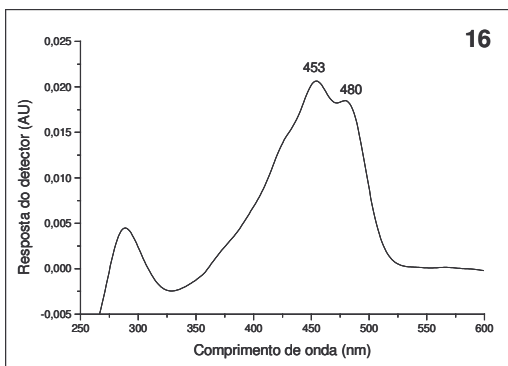
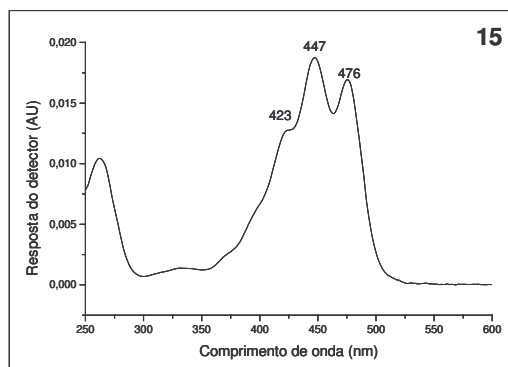
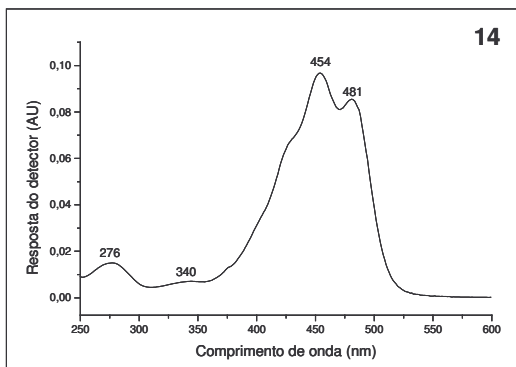
- VAN CALSTEREN, M. R.; CORMIER, F.; DO, C. B. & LAING, R. R. ^1H and ^{13}C NMR assignments of the major anthocyanins from *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Spectroscopy*. 9: 1-15, 1991.
- VANGORSEL, H.; LI C. Y.; KERBEL, E. L.; SMITS M. & KADER, A. .A. Compositional characterization of prune juice. *J. Agric. Food Chem.* 40: 784-789, 1992.
- VINCIERI, F. F.; ROMANINI, A.; BALDI, A.; MULINACCI, N. & ALBERTI, M.B. Analysis HPLC of anthocyanins presents in fluid extracts from *Malva sylvestris* L. flowers and leaves. *Bull Liaison-Groupe Polyphenols*. 16: 339-342, 1992.
- VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA M.; SOUZA, N. E. & VIEIRA, O. A. Caracterização físico-química da acerola *Malpighia glabra* L. produzida em Maringá, Paraná, Brasil. *Arch Latino Am Nutr.* 47: 70-72, 1997.
- WANG, H.; CAO, G.& PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 304-309, 1997.
- WANG, H.; RACE, E. J. & SHRIKHANDE, A. J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 1839-1844, 2003.
- WANG, J.; KALT, W. & SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS anthocyanins in high bush blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3330-3335, 2000.
- WANG, J. & SPORNS, P. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2009-2015, 1999.
- WELLMANN, E. Quantitative analysis of light effect on flavonoid synthesis in plant-cell or tissue-cultures. *Planta Med.* 107-111. Suppl. S., 1975.
- WINGERATH, T.; STAHL, W.; KIRSCH, D.; KAUFMANN, R. & SIES, H. Fruit juice carotenol fatty acid esters and carotenoids identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2006-2013, 1996.
- WROLSTAD, R. E.; GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. & DURST, R. W. Anthocyanins from radishes and red-fleshed potatoes. In:"Chemistry and

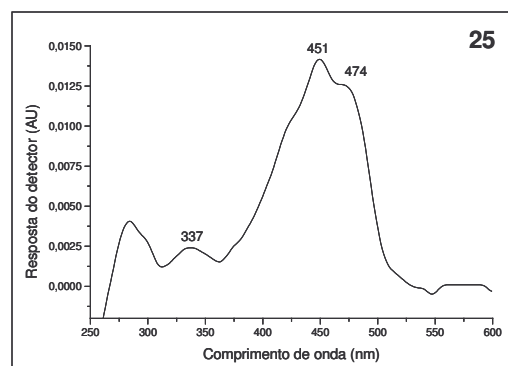
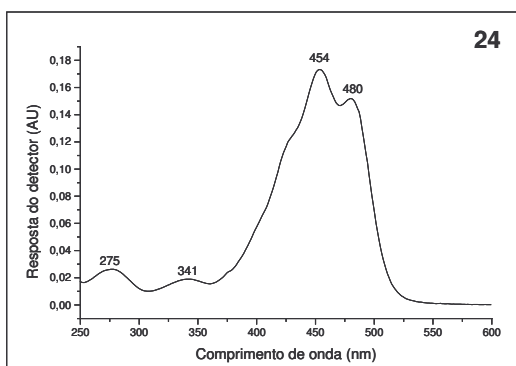
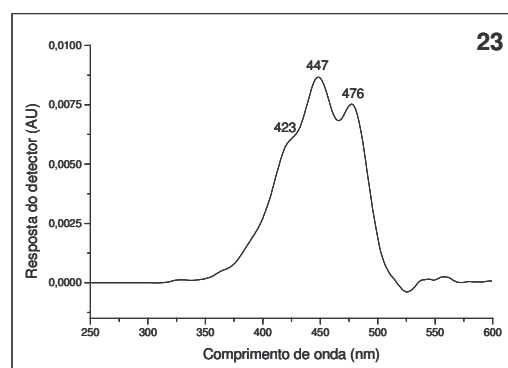
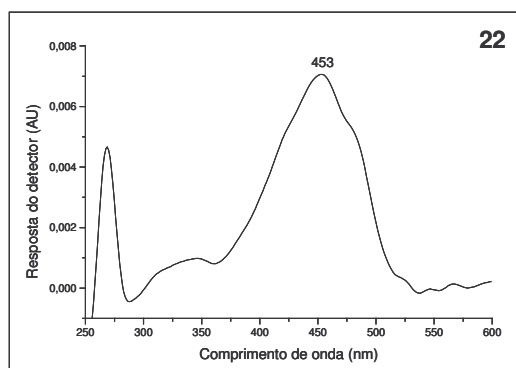
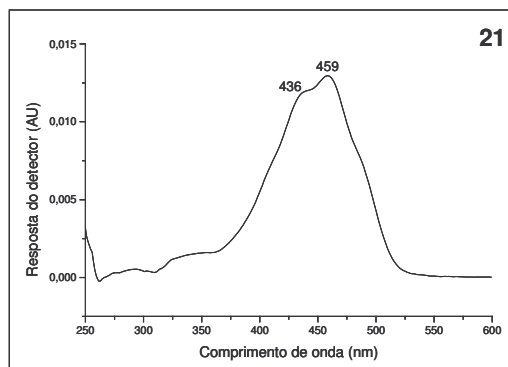
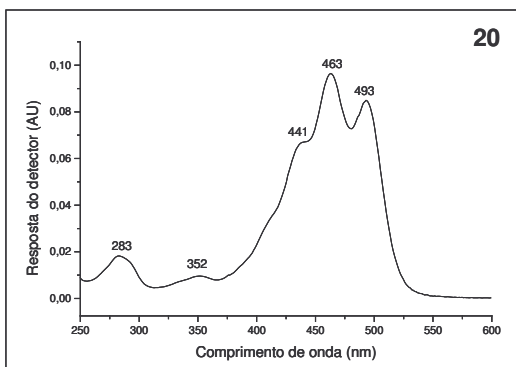
- Physiology of Selected Food Colorants". J. M. Ames and T. H. Hofman (Eds). Am. Chem. Soc. Chapter 5, 66-89, 2001.
- ZAPATA, S. M. & DUFOUR, J. P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: Chemical composition of fruit. *J. Food Sci.* 61: 349-351, 1993.
- ZAPSALIS, C. & FRANCIS, F. J. Cranberry anthocyanins. *J. Food Sci.* 30: 396-399, 1965.

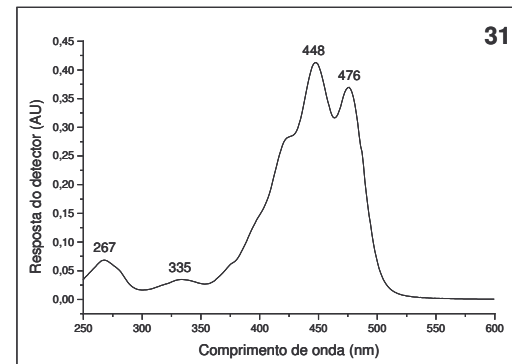
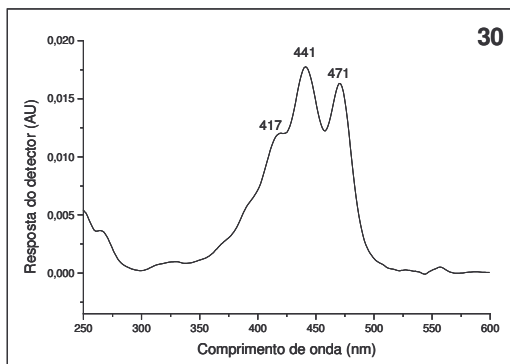
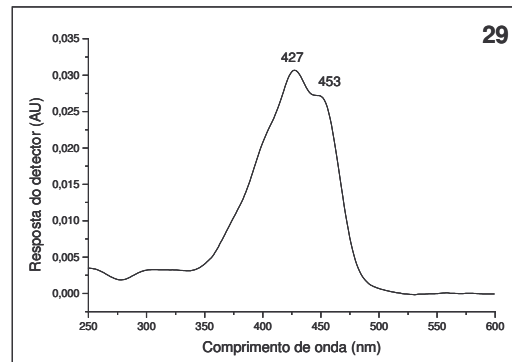
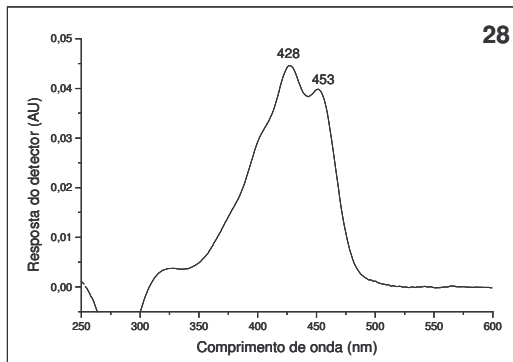
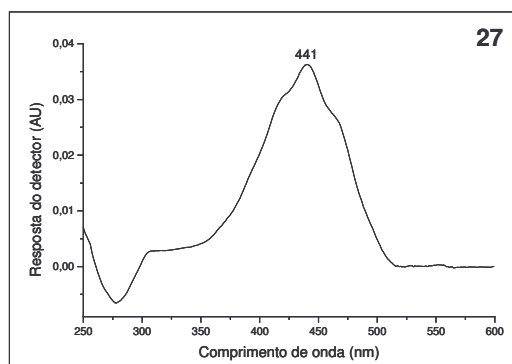
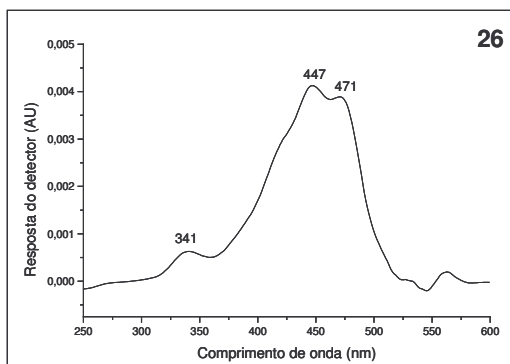
Anexo 1. Espectros de carotenóides de camu-camu, numerados de acordo com os cromatogramas das Figura 16, 17 e 18 e Tabela 12.

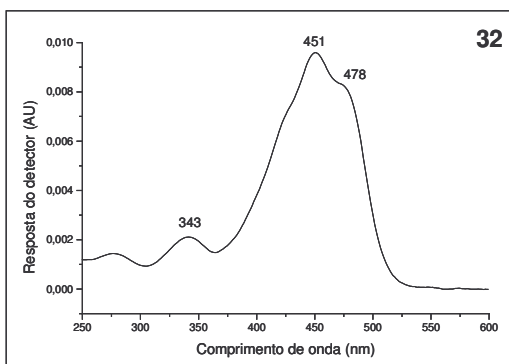
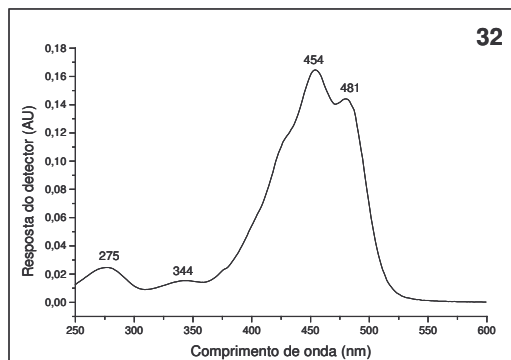
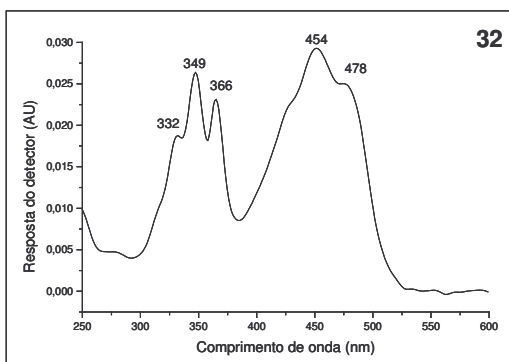




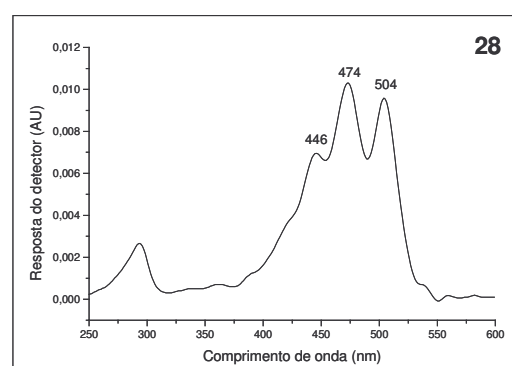
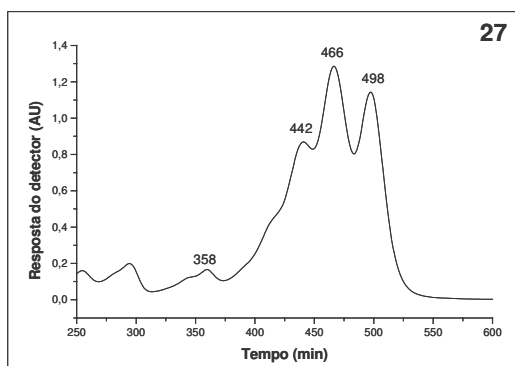
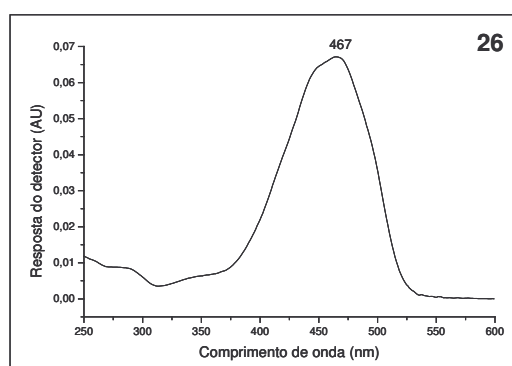
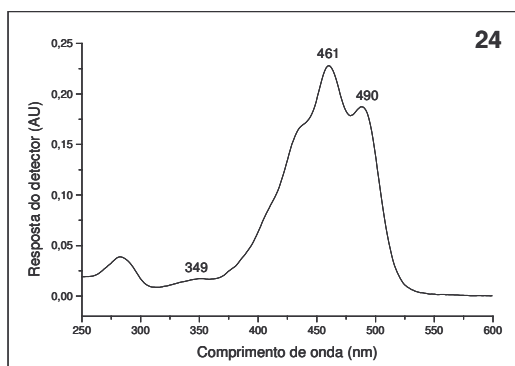
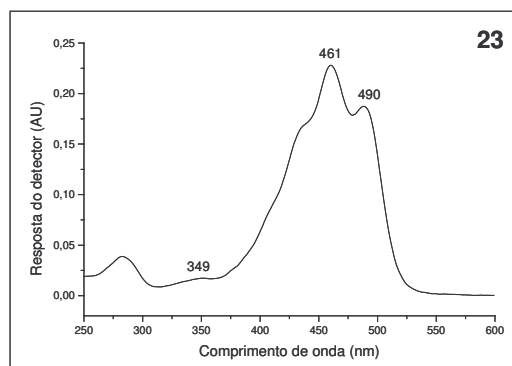
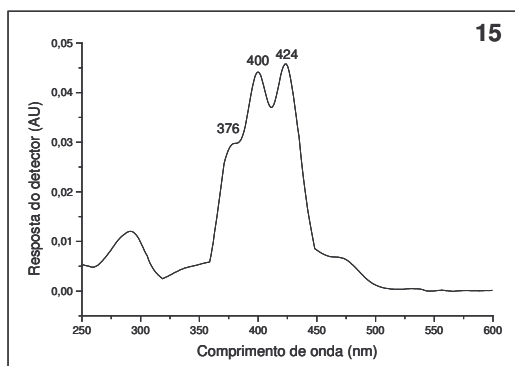








Anexo 2. Espectros de carotenóides de camu-camu, numerados de acordo com o cromatograma da Figura 19 e Tabela 13.



Anexo 3. Espectros de padrões de apocarotenóides, numerados de acordo com o cromatograma da Figura 20.

