

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DE CAROTENÓIDES POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Adriana Zerlotti Uez
casabianca e aprovada pela comissão julga-
dora em 16.12.94.*

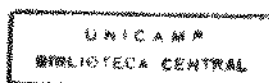
Délia R. Amaya

ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE ¹⁶
Engenheiro de Alimentos ^{m 3000}
Mestre em Ciência de Alimentos

¹⁶
Dra. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA
Orientador

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

CAMPINAS - 1994 -

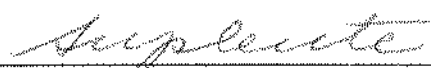


BANCA EXAMINADORA


DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA (ORIENTADORA)

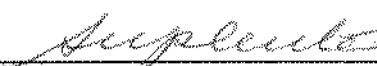

ADILMA R. PIPPA SCAMPARINI


CAROL HOLLINGWORTH COLLINS


FLORINDA ORSATTI BOBBIO


HELENA TEIXEIRA GODOY


JOÃO BOSCO FARIA


MARILENE V. CAMARGO PENTEADO

Campinas, 16 de dezembro de 1994.

À minha mãe Leila,
Maria Eugênia e Fernanda,
pelo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Professora Délia Rodriguez-Amaya, meu especial agradecimento pelo incentivo, orientação, paciência na correção da tese e principalmente pela formação de um espírito científico crítico durante todos esses anos.

Ao Professor George Britton, da Universidade de Liverpool - Inglaterra, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pelas piadas e conversas e pela liberdade concedida durante a minha estadia na Inglaterra. Ao Sr. Mark Prescott, pelas análises no espectrofotômetro de massa.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas na redação final do trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Alimentos da FEA-UNICAMP pelo carinho, amizade e compreensão, em especial à Neura, Marta, Valéria e Silvana. E aos amigos Roland, Reto e Sanda do Laboratório 401 do Departamento de Bioquímica-Universidade de Liverpool que me incentivaram e tornaram a minha permanência na Inglaterra muito agradável.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e do Centro de Informática da FEA, pela ajuda durante todo o período de realização do trabalho.

Ao CNPq pela Bolsa de Doutorado e à CAPES pela Bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior.

À FAPESP pelo financiamento concedido ao projeto.

A todos que me incentivaram e de que uma forma ou de outra deram auxílio para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	pág.
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. Carotenóides da Manga	04
3.2. Carotenóides do Maracujá	05
3.3. Espectrometria de Massas de Carotenóides	09
3.3.1. Fragmentações da cadeia poliênica central	09
3.3.2. Fragmentações de grupos funcionais e terminais	11
3.3.3. Aplicações em alimentos	13
3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	19
3.4.1. Extração e saponificação	19
3.4.2. Separação	21
3.4.3. Identificação	23
3.4.4. Quantificação	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Amostragem e Preparo das Amostras	
4.1.1. Para confirmação da identidade de carotenóides por espectrometria de massas	26
4.1.2. Para determinação da composição quantitativa dos carotenóides da manga e do suco de manga	26
4.1.3. Para verificação da incidência de carotenóides minoritários provitamínicos A em folhas	27

4.2. Etapas Pré-Cromatográficas	27
4.2.1. Obtenção do extrato de carotenóides para espectrometria de massas.....	28
4.2.2. Obtenção do extrato de carotenóides da manga e do seu suco para quantificação	28
4.3. Etapas Cromatográficas	
4.3.1. Isolamento dos carotenóides para posterior análise por espectrometria de massas	28
4.3.1.1. Cuidados necessários	28
4.3.1.2. Preparação das fases estacionárias	31
4.3.1.3. Separação dos carotenóides da manga e do caruru....	31
4.3.1.4. Separação dos carotenóides do maracujá.....	32
4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
4.3.2.1. Manga e suco de manga	36
4.3.2.2. Maracujá.....	36
4.3.2.3. Folhas verdes	37
4.4. Análise Qualitativa	
4.4.1. Espectrofotometria UV/visível	37
4.4.2. Co-cromatografia	37
4.4.3. Reações químicas.....	38
4.4.4. Espectrometria de massas	
4.4.4.1. Avaliação visual	38
4.4.4.2. Purificação final	39
4.4.4.3. Instrumentação	40
4.5. Análise Quantitativa dos Carotenóides da Manga e do Suco de Manga	
4.5.1. Preparo dos padrões.....	40
4.5.1.1. Preparo da solução de padrão interno	40
4.5.1.2. Preparo dos padrões de carotenóides.....	41
4.5.2. Quantificação	41

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Carotenóides da Manga	
5.1.1. Composição qualitativa	48
5.1.1.1. Separação e purificação dos carotenóides.....	48
5.1.1.2. Identificação dos carotenóides.....	50
5.1.2. Composição quantitativa	81
5.1.2.1. Exatidão e precisão do método.....	81
5.1.2.2. Comparação entre os dois cultivares.....	83

5.1.2.3. Efeitos geográficos	85
5.1.2.4. Mudanças relativas durante o amadurecimento	86
5.2. Carotenóides do Suco de Manga	
5.2.1. Composição qualitativa	91
5.2.2. Composição quantitativa	95
5.3. Carotenóides do Maracujá	97
5.3.1. Separação e purificação dos carotenóides.....	97
5.3.2. Confirmação das estruturas por espectrometria de massas	99
5.3.3. Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência.....	119
5.4. Carotenóides Minoritários Provitamínicos A em Verduras Folhosas Verdes.....	125
5.4.1. Incidência e confirmação da α -criptoxantina	125
5.4.2. Incidência de α -caroteno	127
6. CONCLUSÕES.....	136
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	138

ÍNDICE DE TABELAS

	pág.
TABELA 1: Carotenóides detectados em manga.....	06
TABELA 2: Carotenóides detectados em maracujá.....	08
TABELA 3: Fases móveis empregadas para o desenvolvimento das placas de MgO:kieselguhr.....	35
TABELA 4: Solventes e absortividades utilizados para o cálculo da concentração de diversos carotenóides padrões.....	42
TABELA 5: Equação da reta e coeficiente de correlação das curvas de calibração.....	47
TABELA 6: Principais características obtidas por CLAE dos carotenóides da manga.....	52
TABELA 7: Fórmula molecular, λ_{max} , razão <i>m/e</i> e abundância relativa (%) dos fragmentos de massas característicos e íon molecular dos carotenóides da manga.....	53
TABELA 8: Comparação dos teores de β -caroteno e violaxantina obtidos por cromatografia líquida por coluna clássica e por CLAE.....	82
TABELA 9: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (ER/100g) das duas cultivares de manga, no estágio maduro.....	84
TABELA 10: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (ER/100g) da manga, cultivar Keitt, do Estado de São Paulo, em três estádios de maturação.....	87
TABELA 11: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (ER/100g) da manga, cultivar Tommy Atkins, do Estado de São Paulo, em três estádios de maturação.....	88
TABELA 12: Mudanças nas porcentagens dos carotenóides durante o amadurecimento da manga.....	90
TABELA 13: Principais características, obtidas por CLAE, dos carotenóides do suco de manga.....	93

TABELA 14: Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e valor de vitamina A (ER/100g) de três marcas do suco de manga	96
TABELA 15: Fórmula molecular, razão m/e e abundância relativa (%) dos fragmentos de massas característicos e íon molecular dos carotenóides do maracujá.....	100
TABELA 16: Máximos de absorção de alguns carotenóides citados na literatura e dos identificados em maracujá.....	101
TABELA 17: Comprovação por CLAE da incidência de α -caroteno nas verduras folhosas brasileiras estudadas	130
TABELA 18: Incidência de α -caroteno em 3 verduras folhosas reportada da literatura.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1: Produção de algumas frutas no Brasil, em 1989.....	07
FIGURA 2: Esquema da eliminação de a- tolueno e b- m-xileno da cadeia poliênica central de carotenóides	10
FIGURA 3: Estruturas de carotenos acíclicos e suas fragmentações características	12
FIGURA 4: Estruturas do β -caroteno e da β -criptoxantina, e formação do fragmento $[M - 136 + R]^+$	14
FIGURA 5: Estruturas do α -caroteno e da α -criptoxantina, e formação dos fragmentos a- $[M-55+R]^+$ e b- $[M-122+R]^+$	15
FIGURA 6: Formação dos fragmentos característicos de grupos epóxidos, a- $[M-80]^+$, b- $[164+R]^+$, c- $[204+R]^+$ e d- $[(336+R) -H]^+$	16
FIGURA 7: Esquema das etapas pré-cromatográficas utilizadas em conjunto com espectrometria de massas	29
FIGURA 8: Esquema das etapas pré-cromatográficas utilizadas para posterior quantificação por CLAE	30
FIGURA 9: Esquema geral de isolamento e purificação de carotenóides para análise por espectrometria de massas	34
FIGURA 10: Curvas padrão de a- β -caroteno e b- β -criptoxantina.....	43
FIGURA 11: Curvas padrão de a- zeaxantina e b- luteoxantina	44
FIGURA 12: Curvas padrão de a- violaxantina e b- 9- <i>cis</i> -violaxantina	45
FIGURA 13: Curvas padrão de a- <i>cis</i> -neoxantina e b- auroxantina	46
FIGURA 14: Separação e purificação dos carotenóides da manga.....	49
FIGURA 15: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga.....	51

FIGURA 16: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- β -caroteno, b- <i>cis</i> - β -criptoxantina, c- β -criptoxantina e d- zeaxantina.....	54
FIGURA 17: Cromatogramas parciais e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, após reação de isomerização de a- β -caroteno, b- <i>cis</i> - e <i>trans</i> - β -criptoxantina e c- zeaxantina.....	55
FIGURA 18: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do β -caroteno, isolado de manga	56
FIGURA 19: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do epóxi- β -caroteno, isolado de manga.....	58
FIGURA 20: Espectros de absorção do pico 3, obtidos pelo DAD	59
FIGURA 21: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da β -criptoxantina, isolada de manga.....	61
FIGURA 22: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da zeaxantina, isolada de manga.....	62
FIGURA 23: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da luteína, isolada de manga	63
FIGURA 24: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- <i>trans</i> -luteoxantina, b- <i>cis</i> -luteoxantina A, c- <i>cis</i> -luteoxantina B e d- mistura não identificada.....	64
FIGURA 25: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, dos isômeros de luteoxantina em etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (----)	66
FIGURA 26: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da luteoxantina, isolada de manga	67
FIGURA 27: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da violaxantina, isolada de manga	68
FIGURA 28: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- <i>trans</i> -violaxantina, b- 9- <i>cis</i> -violaxantina e c- 13- <i>cis</i> -violaxantina.....	69

FIGURA 29: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da violaxantina em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (—x—) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (—x—).....	70
FIGURA 30: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, da fração de violaxantina, após adição de HCl 0,1N	71
FIGURA 31: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da 9- <i>cis</i> -violaxantina em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (—x—) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (—x—).....	72
FIGURA 32: Cromatograma parcial, obtido por CLAE, enfocando violaxantina, do extrato de manga após reação de isomerização e espectros de absorção obtidos pelo DAD	74
FIGURA 33: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- <i>cis</i> -neoxantina e b- <i>trans</i> -neoxantina	75
FIGURA 34: Cromatograma parcial, obtido por CLAE, enfocando neoxantina, do extrato de manga após reação de isomerização e espectros de absorção obtidos pelo DAD.....	76
FIGURA 35: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, da fração de neoxantina após adição de HCl 0,1N	77
FIGURA 36: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da <i>cis</i> -neoxantina isolada de couve em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (—x—) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (—x—)	78
FIGURA 37: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da neoxantina, isolada de manga	79
FIGURA 38: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato do suco de manga	92
FIGURA 39: Espectro de absorção da auroxantina, obtido pelo DAD.....	94
FIGURA 40: Separação e purificação dos carotenóides do maracujá	98
FIGURA 41: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do licopeno, isolado de maracujá	102

FIGURA 42: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do prolicopeno, isolado de maracujá.....	103
FIGURA 43: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, em éter etílico, do prolicopeno antes (—) e após reação de isomerização (----).....	104
FIGURA 44: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do ζ -caroteno, isolado de maracujá.....	105
FIGURA 45: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do neurosporeno, isolado de maracujá	106
FIGURA 46: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da fração contendo fitoeno e fitoflueno, isolada de maracujá.....	108
FIGURA 47: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do β -caroteno, isolado de maracujá	109
FIGURA 48: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do epóxi- β -caroteno, isolado de maracujá.....	110
FIGURA 49: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da β -criptoxantina, isolada de maracujá.....	112
FIGURA 50: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da β -citraurina, isolada de maracujá	113
FIGURA 51: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do β -citraurinol, produto de redução da β -citraurina.....	114
FIGURA 52: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, em éter etílico, da β -citraurina antes (—) e após reação de redução (----)	115
FIGURA 53: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da anteraxantina, isolada de maracujá.....	116
FIGURA 54: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da violaxantina, isolada de maracujá.....	117
FIGURA 55: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da neoxantina, isolada de maracujá.....	118

FIGURA 56: Cromatograma, obtido por CLAE com coluna de C_{18} , do extrato de maracujá	120
FIGURA 57: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 8: β -criptoxantina, 9: prolicopeno, 10: mistura, 11: <i>cis</i> - ζ -caroteno, 12: ζ -caroteno, 13: fitoflueno e β -caroteno, 14: fitoeno	121
FIGURA 58: Cromatograma, obtido por CLAE com coluna de ciano, do extrato de maracujá.....	122
FIGURA 59: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 7, 9, 11, 13 e 15	123
FIGURA 60: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 6: 5,8-époxi- β -caroteno, 8: β -criptoxantina, 10: β -citraurina, 12: zeaxantina, 14: anteraxantina, 16 e 17: violaxantina, 18 e 19: neocromo, 20: neoxantina.....	124
FIGURA 61: Estrutura dos carotenóides monoidroxilados: β -criptoxantina, α -criptoxantina e zeinoxantina.....	126
FIGURA 62: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, em metanol-água (98:2), da a- α -criptoxantina e do b- α -caroteno	128
FIGURA 63: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da α -criptoxantina, isolada de caruru.....	129
FIGURA 64: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de taioba.....	131
FIGURA 65: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de rúcula	132
FIGURA 66: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de taioba fortificado com α -caroteno	133

ÍNDICE DE ANEXO

	pág.
ANEXO 1: Espectro de absorção do Sudan I, em metanol, e sua fórmula estrutural	151

RESUMO

Devido a várias funções ou ações atribuídas aos carotenóides, tem havido um amplo esforço mundial para se obter dados analíticos confiáveis sobre esses compostos. Como há um número muito grande de carotenóides, um dos maiores problemas analíticos é a sua identificação conclusiva. O uso criterioso de parâmetros clássicos de identificação (tempo de retenção, co-cromatografia, espectros de absorção e reações químicas), aplicados à cromatografia líquida de alta eficiência, permitiu a identificação dos seguintes carotenóides da manga cultivares, Keitt e Tommy Atkins: *trans*- β -caroteno, β -criptoxantina (*cis* e *trans*), *trans*-zeaxantina, luteoxantina (*cis* e *trans*), violaxantina (*trans*, 9-*cis* e 13-*cis*) e neoxantina (*cis* e *trans*). Sem especificação da forma geométrica (isomérica), estes carotenóides e adicionalmente luteína e epoxi- β -caroteno tiveram suas identidades confirmadas por espectrometria de massas. Todos os espectros de massas dos carotenóides mostraram o pico do íon molecular e as esperadas fragmentações características. A composição quantitativa foi determinada por CLAE com padronização interna, empregando Sudan I. Uma coluna de ciano, com gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel, foi utilizada porque proporcionou uma melhor separação das xantofilas em comparação com a coluna de C_{18} , e possibilitou o uso de Sudan I como padrão interno. As mangas Keitt e Tommy Atkins apresentaram *trans*-violaxantina como o principal carotenóide, seguido de 9-*cis*-violaxantina e β -caroteno. Apesar de ter ocorrido uma variação razoável entre lotes da mesma cultivar, *trans*-violaxantina, 9-*cis*-violaxantina, neoxantina e *cis*-neoxantina tenderam a teores maiores na cv. Tommy Atkins, enquanto o conteúdo de zeaxantina foi maior na cv. Keitt. Comparando a composição de carotenóides das mangas Keitt provenientes de dois Estados, verificou-se que o β -caroteno apresentou concentração duas vezes maior na manga procedente da Bahia, Estado com clima mais quente, do que na procedente de São Paulo. Os teores de *trans*- e 9-*cis*-violaxantina também foram maiores nas mangas da Bahia, aproximando-os dos níveis encontrados na cv. Tommy Atkins de São Paulo. Durante o amadurecimento das mangas Keitt e Tommy Atkins, os teores de β -caroteno e violaxantina praticamente triplicaram, 9-*cis*-violaxantina quadruplicou e a pequena quantidade de 13-*cis*-violaxantina desapareceu ou ficou reduzida a traços. Houve um ligeiro aumento de β -criptoxantina, luteoxantina e neoxantina durante o amadurecimento das frutas. Em termos de porcentagens, apenas pequenas transformações foram notadas, sendo a mudança mais nítida a diminuição de neoxantina e 13-*cis*-violaxantina. Com o desaparecimento da violaxantina, os sucos de manga de três marcas comerciais apresentaram β -caroteno como carotenóide predominante, seguido de auroxantina, carotenóide ausente na fruta fresca. Os teores de β -caroteno se situaram dentro da faixa obtida para a manga "in natura". Com o auxílio do espectro de absorção no UV-visível, espectro de massas e,

quando necessário, reações de isomerização e redução, foram identificados treze carotenóides em maracujá: fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno (principal), neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, epoxi- β -caroteno, β -criptoxantina, β -citraurina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina. As duas colunas (C_{18} e ciano) com várias combinações de solventes como fase móvel, não se mostraram eficientes para separar os carotenóides do maracujá. Também utilizando espectrometria de massas, confirmou-se o carotenóide monoidroxilado, encontrado em verduras folhosas brasileiras, como sendo a α -criptoxantina. Este carotenóide, embora em pequena quantidade, foi detectado em todas as onze verduras analisadas, enquanto o α -caroteno foi encontrado em apenas quatro dessas verduras.

SUMMARY

Considering the many functions or actions attributed to carotenoids, there is a worldwide effort to obtain reliable analytical data on these compounds. Since there is a large number of natural carotenoids, one of the main analytical problems is conclusive identification. With the combined use of classical parameters (retention time, spiking, visible absorption spectra and chemical reactions) applied to high performance liquid chromatography (HPLC), the following carotenoids were identified in mango cultivars Keitt and Tommy Atkins: *trans*- β -carotene, β -cryptoxanthin (*cis* and *trans*), *trans*-zeaxanthin, luteoxanthin (*cis* and *trans*), violaxanthin (*trans*, 9-*cis* and 13-*cis*) and neoxanthin (*cis* and *trans*). Mass spectrometry confirmed the identity, but not the geometric (isomeric) form, of these carotenoids, additionally detecting lutein and epoxy- β -carotene when a large amount of sample was utilized. All carotenoids showed the molecular ion peak and the expected characteristic fragmentations. The quantitative composition was determined by HPLC with internal calibration, using Sudan I. A nitrile column, with a gradient of acetone in n-hexane as mobile phase, was utilized because it allowed better separation of the xanthophylls than the C₁₈ column and Sudan I could be used as internal standard. The mango cultivars Keitt and Tommy Atkins presented *trans*-violaxanthin as the major carotenoid followed by 9-*cis*-violaxanthin and β -carotene. Although some variation occurred between lots of the same cultivar, *trans*-violaxanthin, 9-*cis*-violaxanthin, neoxanthin and *cis*-neoxanthin tended to have higher levels in cv. Tommy Atkins. On the other hand, the zeaxanthin content was higher in cv. Keitt. Comparing the carotenoid composition of mangoes Keitt from two different states, the β -carotene level in mangoes from Bahia State, a state with a hot climate, was twice that of São Paulo mangoes. The *trans*- and 9-*cis*-violaxanthin contents were also higher in the mangoes from Bahia, being closer to the levels found in Tommy Atkins, from São Paulo. During ripening of the mangoes cv. Keitt and Tommy Atkins, β -carotene and violaxanthin increased three-fold and 13-*cis*-violaxanthin four-fold. The small amount of 13-*cis*-violaxanthin disappeared or was reduced to trace amount. β -Cryptoxanthin, luteoxanthin and neoxanthin contents increased slightly with ripening. In terms of percentages, only small transformations could be observed, the most distinct change being the decrease of neoxanthin and 13-*cis*-violaxanthin. With the disappearance of violaxanthin, the mango juice of three commercial brands presented β -carotene as the major carotenoid followed by auroxanthin, which was not detected in the fresh fruit. The β -carotene contents fell within the range obtained for fresh mangoes. Using the data from chromatographic behavior, UV-visible spectra, mass spectra and, when necessary, specific chemical reactions, thirteen carotenoids were identified in passion fruit: phytoene, phytofluene, ζ -carotene (principal),

neurosporene, β -carotene, lycopene, prolycopene, epoxi- β -carotene, β -cryptoxanthin, β -citraurin, antheraxanthin, violaxanthin and neoxanthin. Many solvent systems and two columns (C_{18} and ciano) were tested but were found inefficient to separate all the passion fruit carotenoids. Mass spectrometry was also employed to confirm the monohydroxy carotenoid found in Brazilian leafy vegetables as α -cryptoxanthin. This carotenoid was detected in all of the eleven leaves analysed while α -carotene was found only in four.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais, encontrados em fungos, bactérias, animais, em todos os tecidos verdes de plantas e também de órgãos não fotossintéticos como frutas, flores, sementes e raízes (SIMPSON & CHICHESTER, 1981). Já foram isolados cerca de 800 carotenóides e mais de 600 tiveram suas estruturas elucidadas (STRAUB, 1987). Somente uma parte deste número foi detectada em alimentos, mas ainda assim a sua composição é considerada complexa. As frutas de origem tropical são mais ricas em carotenóides que as de clima temperado e, embora várias frutas já tenham sido analisadas, existem ainda muitas outras a serem estudadas.

Em termos tecnológicos, a importância dos carotenóides continua sendo como agente corante. A cor é um importante indicador da qualidade dos alimentos e, com a preocupação quanto aos efeitos alérgicos e possíveis propriedades carcinogênicas dos corantes artificiais, os carotenóides e outros corantes naturais estão ganhando a preferência dos consumidores, especialmente na Europa.

A função biológica mais fundamentada é a atividade provitamínica A de alguns carotenóides, mas o maior destaque nos últimos anos tem sido a ação potencial dos mesmos, provitamínicos ou não, contra o câncer. Outras funções, como atividade antiúlcera gástrica, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças cardiovasculares foram, citadas (MATHEWS-ROTH, 1982, 1985; JAVOR *et alii*, 1983; COLDITZ *et alii*, 1985; RITEMBAUGH, 1987; BENDICH, 1989, 1994; GERSTER, 1991; KRINSKY, 1994). Como a cor e a bioatividade variam com a estrutura, é de extrema importância a disponibilidade de dados confiáveis, tanto qualitativos como quantitativos, sobre os carotenóides presentes em alimentos.

Apesar dos avanços instrumentais, que permitem a separação, identificação e quantificação de misturas complexas de carotenóides, o principal pré-requisito na obtenção de dados confiáveis ainda é o analista competente. É de extrema importância que o analista tenha um bom conhecimento da natureza dos carotenóides e esteja atento às inerentes dificuldades práticas e problemas associados a este tipo de análise. É fácil obter uma resposta errada com um alto grau de precisão (SCOTT, 1992; PFANDER *et alii*, 1994).

Com a introdução da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), numerosos trabalhos têm sido publicados sobre a separação de carotenóides em alimentos, mas somente em alguns poucos a composição quantitativa foi determinada.

Os dados apresentados para amostras de um mesmo alimento são discrepantes, e, em alguns casos, o grau de discordância foi bem maior do que entre resultados obtidos por cromatografia líquida em coluna clássica (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Mesmo apresentando grande potencial, a CLAE não pode ainda ser considerada uma técnica ideal. A identificação dos carotenóides, na maior parte dos trabalhos, foi baseada na comparação do tempo de retenção dos carotenóides com o do respectivo padrão, co-cromatografia e, às vezes, espectro de absorção no visível utilizando o detector por conjunto de diodos.

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica poderosa no estabelecimento da estrutura de carotenóides, sempre fornece a massa molecular e alguns dos fragmentos obtidos por impacto de elétrons são indicativos dos grupos terminais. Porém, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura, utilizaram EM para a elucidação ou confirmação das estruturas de carotenóides em fungos, algas e bactérias, raramente de carotenóides presentes em alimentos.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Confirmar por espectrometria de massas a identidade dos carotenóides de duas frutas tropicais, manga e maracujá;
- Verificar a confiabilidade dos parâmetros clássicos (tempo de retenção, co-cromatografia e algumas reações químicas) na identificação conclusiva de carotenóides comuns;
- Determinar, por cromatografia líquida de alta eficiência, a composição quantitativa dos carotenóides de manga e de suco de manga , bem como verificar as influências de cultivar, efeitos geográficos e estágio de maturação;
- Confirmar por espectrometria de massas a identidade do carotenóide monoidroxilado das várias verduras folhosas brasileiras e verificar a incidência desse carotenóide e do α -caroteno nestas folhas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os carotenóides presentes em alimentos são geralmente tetraterpenóides (C_{40}) formados por oito unidades isoprênicas, unidas de tal modo que o plano de simetria é reverso no centro. Os dois grupos metílicos centrais são separados por seis átomos de carbono e os outros por cinco. A principal característica dos carotenóides é a série de duplas ligações conjugadas, responsável por suas especiais propriedades e funções. A estrutura básica pode ser modificada de várias maneiras, como ciclização, migração de dupla ligação, introdução de grupos substituintes, hidrogenação parcial, desidrogenação, extensão ou encurtamento da cadeia, rearranjo, isomerização ou combinações dessas, resultando numa imensa gama de compostos. Estes compostos são tradicionalmente citados por seus nomes triviais.

Os carotenóides hidrocarbonetos (p.ex. β -caroteno e licopeno) são conhecidos como carotenos e os derivados oxigenados como xantofilas. Os substituintes oxigenados mais comumente encontrados são grupos hidroxílicos (como na β -criptoxantina), carbonílicos (como na β -citraurina) e epóxidos (como na violaxantina). Os carotenóides podem ser acíclicos (ζ -caroteno, licopeno), monocíclicos (δ - e γ -caroteno) ou bicíclicos (α - e β -caroteno). A ciclização é limitada à formação de anel de seis membros em uma ou nas duas extremidades da molécula.

3.1. Carotenóides da Manga

A manga é nativa do sul e sudoeste da Ásia. É uma das frutas tropicais e subtropicais mais importantes em termos de produção, área plantada e popularidade. A crescente demanda dos países de clima temperado para frutas frescas vem favorecendo um aumento da produção. A Índia é o principal país produtor; o Brasil está dentre os outros maiores. A cor característica amarelo-laranja da polpa é devida à presença de carotenóides.

Vários autores determinaram o teor de carotenóides totais (RAMARSANA *et alii*, 1946; SADANA & AHMAD, 1946; MORGA *et alii*, 1979), carotenos totais (YAMAMOTO *et alii*, 1932; SPEEK *et alii*, 1988; WILBERG, 1991) ou, além desses, xantofilas totais (THOMAS, 1975).

Dos três estudos (JUNGALWALA & CAMA, 1963; JOHN *et alii*, 1970; GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989) em que foi determinada a composição de

carotenóides, somente GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) quantificaram todos os 8 carotenóides, separados em cinco cultivares de manga. Nos dois outros, a análise qualitativa foi mais detalhada, porém o teor de carotenóides totais foi estimado com base na absorvância a 445 nm e o dado quantitativo dos vários carotenóides foi expresso em porcentagens relativas. JUNGALWALA & CAMA (1963) identificaram 16 carotenóides em manga Alphonso. JOHN *et alii* (1970) seguiram a distribuição de carotenóides em manga Badami, identificando 15, 14 e 17 carotenóides nos estádios verde, parcialmente maduro e maduro, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta os carotenóides detectados nos estudos em que foi determinada a composição de carotenóides. É interessante ressaltar que em todos estes trabalhos encontrou-se um grande número de 5,8 epóxidos, provavelmente devido às várias recromatografias empregadas. Nos dois estudos com cultivares indianos, utilizou-se 1 kg de amostra, a saponificação foi drástica e várias colunas foram usadas para separar os carotenóides. No estudo que foi quantitativo, menor quantidade de amostra (100g) foi utilizada, a saponificação foi branda e somente uma coluna foi empregada; entretanto, os epóxicarotenóides foram separados em placa de sílica gel.

3.2. Carotenóides do Maracujá

O maracujá, nativo do Brasil, é atualmente produzido em várias regiões tropicais. A produção brasileira dessa fruta ultrapassa a da manga, goiaba e mamão (Figura 1) (IBGE, 1991). O Brasil é o maior exportador mundial de suco de maracujá.

A primeira investigação sobre carotenóides do maracujá data de 1958 e foi conduzida por PRUTHI & LAL que detectaram fitoflueno, ζ -caroteno, β -caroteno, α -caroteno e três pigmentos não identificados com máximos de absorção a 425 nm. LEUENBERGER & THOMMEN (citados por GROSS, 1987) encontraram estes mesmos carotenóides mais criptoxantina, auroxantina, mutatoxantina, β -apo-12'-carotenal e β -apo-8'-carotenal. CECCHI (1978) encontrou além de ζ -caroteno (principal pigmento), β -caroteno, neurosporeno, licopeno, γ -caroteno, aurocromo, criptocromo e auroxantina. Um resumo destes resultados encontra-se na Tabela 2. Diante dos dados discrepantes na literatura, MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA (1991) realizaram uma triagem em maracujá e encontraram 5 carotenos, 1 monoidroxilado, 3 diidroxilados, 1 triidroxilado e 2 outros carotenóides, indicando a ocorrência de um número muito maior de carotenóides do que o relatado previamente.

TABELA 1: Carotenóides detectados em manga.

Carotenóide	Jungalwala & Cama (1963) ^a	John <i>et alii</i> (1970) ^b	Godoy & Rodriguez-Amaya (1989) ^c
<i>cis</i> -β-caroteno	x	x	-
β-caroteno	x	x	x
5,6-epóxi-β-caroteno	x	x	-
mutatocromo	x	x	x
fitoeno	x	x	-
fitoflueno	x	x	-
γ-caroteno	x	x	-
ζ-caroteno	-	-	x
β-criptoxantina	x	x	-
α-criptoxantina	-	-	x
criptoflavina	-	x	-
anteraxantina	x	x	-
<i>cis</i> -anteraxantina	x	x	-
zeaxantina	x	x	-
violaxantina	x	-	x
<i>cis</i> -violaxantina	x	x	-
luteoxantina	x	x	x
mutatoxantina	x	x	x
auroxantina	x	x	x
não identificado	-	x	-

^a Manga cv. Alphonso.
^b Manga cv. Badami.
^c Manga cv. Tommy Atkins, Bourbon, Haden, Extrema e Ouro.
x: presença
-: ausência

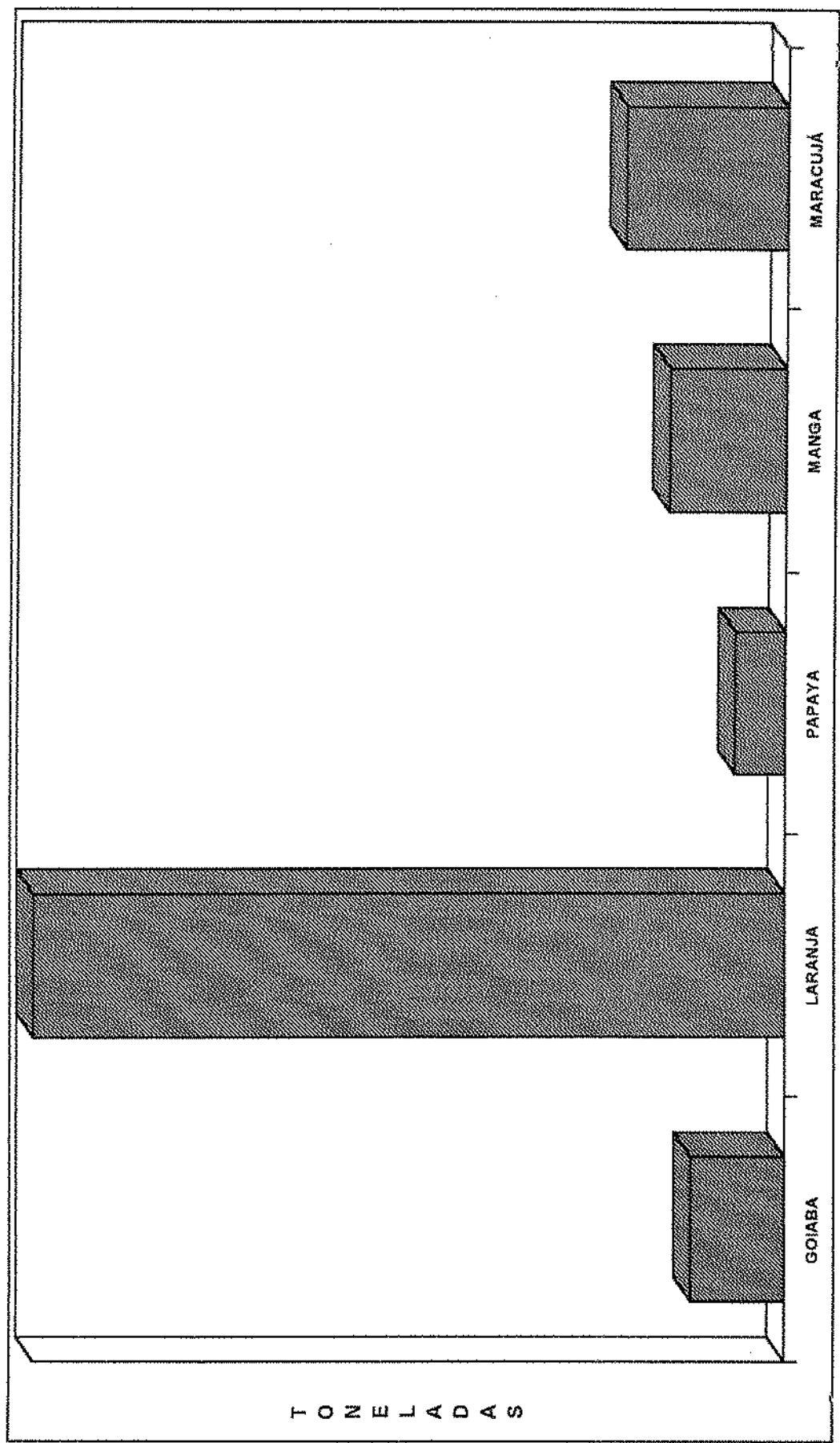


FIGURA 1: Produção de algumas frutas no Brasil em 1989.
(Fonte: IBGE, 1991)

TABELA 2: Carotenóides detectados em maracujá.

Carotenóide	Pruth & Lal (1958) ^a	Leuenberger & Thommen (1972) ^b	Cecchi (1978)
fitoflueno	x	x	- ^c
ζ-caroteno	x	x	x
α-caroteno	x	-	x
β-caroteno	x	x	x
γ-caroteno	-	-	x
neurosporeno	-	-	x
licopeno	-	-	x
β-apo-12'-carotenal	-	x	-
β-apo-8'-carotenal	-	x	-
mutatoxantina	-	x	-
criptoxantina	-	x	-
criptocromo	-	-	x
auroxantina	-	x	-
NI ^d	x	-	-
NI ^e	-	-	x

^a Maracujá rosa.

^b Citado por GROSS, 1987.

^c O autor não procurou por carotenóides incolores.

^d Três compostos não identificados com $\lambda_{\max}$ a 425 nm.

^e Caroteno não identificado com $\lambda_{\max}$ a 435 nm.

x: presença

-: ausência

3.3. Espectrometria de Massas de Carotenóides

A espectrometria de massas (EM) por impacto de elétrons é o método tradicional e continua sendo o método de ionização preferido para carotenóides. A grande maioria dos carotenóides apresenta o pico do íon molecular e consequentemente a massa molecular. Entretanto, para se determinar inequivocadamente a fórmula molecular é necessário um instrumento de alta resolução (BRITTON & YOUNG, 1993).

Como o perfil de fragmentação dos carotenóides induzido por impacto de elétrons e os produtos de sua decomposição térmica não podem ser usualmente separados, o perfil como um todo é chamado de espectro de massas do carotenóide. Uma característica do espectro da maioria dos carotenóides é o grande número de picos intensos na região de massas baixas e a escassez de picos ao redor do pico do íon molecular. Como consequência, os picos característicos, mesmo aqueles de baixa intensidade, podem ser claramente reconhecidos nesta região. Por outro lado, a maioria dos picos presentes na região de massas baixas possuem pequeno significado estrutural, pois a intensidade relativa desses picos é similar para a maioria dos carotenóides (VETTER *et alii*, 1971).

Fragmentações características têm sido utilizadas para diagnosticar alguns aspectos estruturais. Algumas delas fornecem informações primárias sobre a cadeia poliênica e outras sobre grupos funcionais ou grupos terminais dos carotenóides.

3.3.1. Fragmentações da cadeia poliênica central

Todos os carotenóides sofrem reações nas quais a cadeia poliênica central é dobrada e partes desta são, então, eliminadas. As mais estudadas foram as perdas de tolueno (92 unidades de massa - u.m.) e de m-xileno (106 u.m.) (Figura 2). Perdas similares de 79 e 158 u.m. ocorrem frequentemente, mas os íons produzidos são de baixa intensidade e, portanto, de pouca utilidade na interpretação dos espectros. As eliminações de tolueno e m-xileno são consideradas como características dos carotenóides em geral, embora ainda se desconheça a extensão da ionização proveniente da molécula original e da eliminação térmica (ENZELL & BROMAN, 1994).

Em carotenóides que possuem menos que 9 duplas ligações conjugadas observou-se perda de tolueno, mas não de m-xileno (VETTER *et alii*, 1971; ENZELL

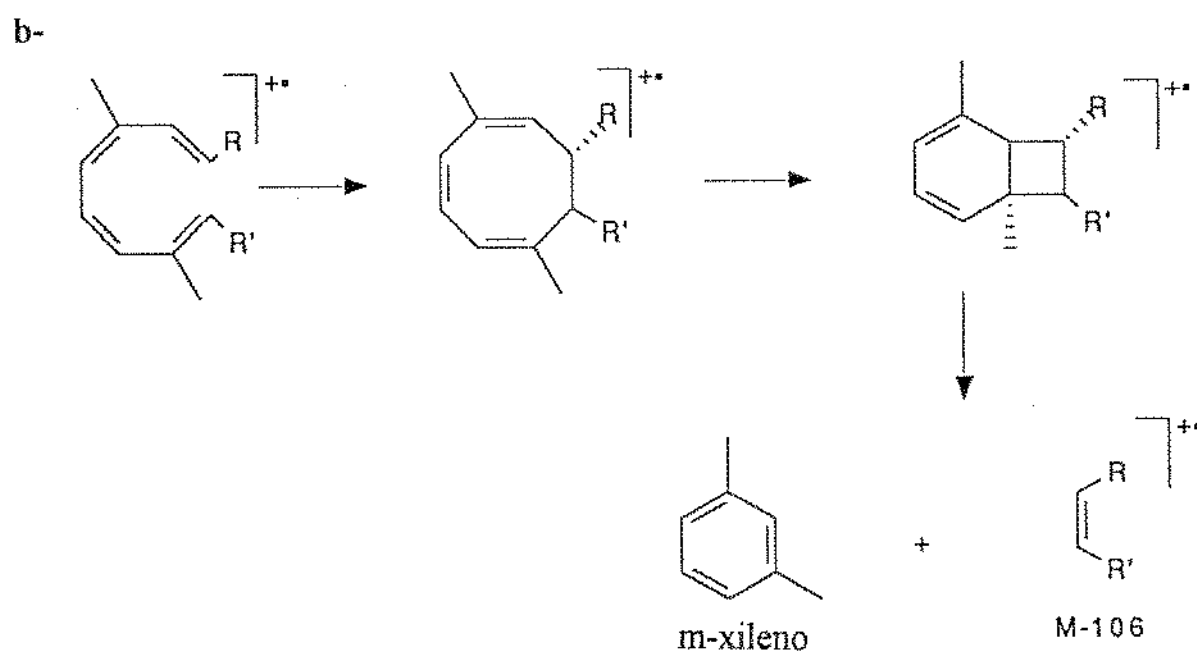
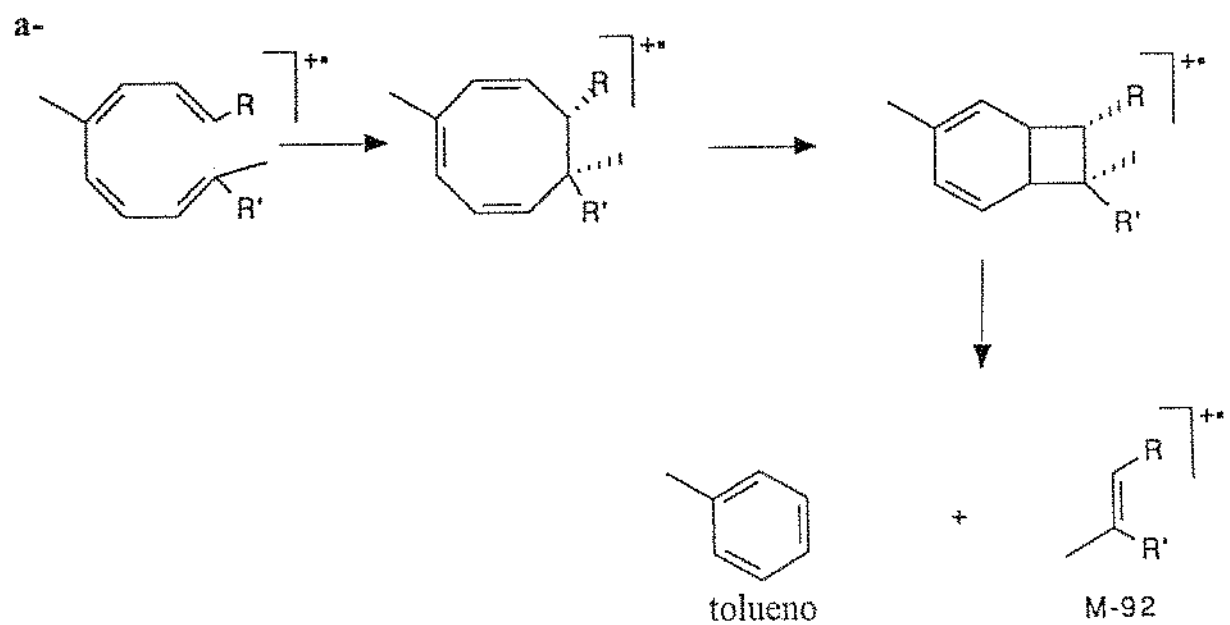


FIGURA 2: Esquema da eliminação de a- tolueno e b- m-xileno da cadeia poliênica central de carotenóides.

& BROMAN, 1994). Carotenóides com alto grau de saturação, principalmente o ζ -caroteno, mostram perda de 94 u.m., a exemplo da perda de tolueno (BRITTON & YOUNG, 1993; ENZELL & BROMAN, 1994).

Observou-se uma relação inversa entre a razão das abundâncias dos íons $[M-92]^+$ e $[M-106]^+$ e o número de duplas ligações conjugadas em carotenóides acíclicos, quando os grupos terminais não continham oxigênio (ENZELL *et alii*, 1968). Esta razão também pode ser uma boa indicação do grau de ciclização dos carotenos, isto é, para os carotenóides acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, a razão está na faixa de 0,02 - 0,03, 0,6 - 1,0 e de 2 - 10, respectivamente (BRITTON & YOUNG, 1993).

3.3.2. Fragmentações de grupos funcionais e terminais

A presença de grupos funcionais nos carotenóides é indicada por fragmentações características, além das fragmentações comuns como a eliminação de água. Os modos de fragmentação que resultam da presença de um determinado grupo funcional não são, normalmente, influenciados pelo comprimento da cadeia conjugada e pela presença do outro grupo terminal. Entretanto, a grande diferença de estabilidade entre dois grupos terminais pode dificultar a detecção de picos pertencentes ao grupo mais estável (ENZELL & BROMAN, 1994). VETTER *et alii* (1971) e ENZELL & BROMAN (1994) apresentaram, em seus capítulos sobre EM de carotenóides, extensivas listas de grupos terminais e seus fragmentos característicos.

A maioria dos grupos acíclicos fragmenta-se pela ruptura de ligações ativas e por eliminação de grupos funcionais, com a transferência de hidrogênio tanto do maior fragmento como para o maior fragmento (ENZELL & BROMAN, 1994). Alguns exemplos estão apresentados na Figura 3. O fragmento de massa 69, proveniente da clivagem entre os carbonos 3 e 4, se torna necessariamente o pico base quando o carotenóide possui dois grupos terminais acíclicos (designados Ψ), como o licopeno. A retenção da carga no fragmento de maior massa origina um pico importante, a m/e M-69, embora sua intensidade seja algumas vezes baixa (ENZELL *et alii*, 1969). Devido à redução na dupla ligação 7,8 (Figura 3), há surgimento do proeminente pico a m/e M-137 e 137, como resultado da clivagem entre os carbonos 7 e 8 (ENZELL *et alii*, 1969). Reduções adicionais, presentes no fitoflueno e fitoeno, promoveram a clivagem das ligações simples ativas localizadas entre as duplas ligações não conjugadas, levando à produção de íons abundantes espaçados em 68 u.m., isto é, M-69, M-137, M-205, etc (ENZELL *et alii*, 1969).

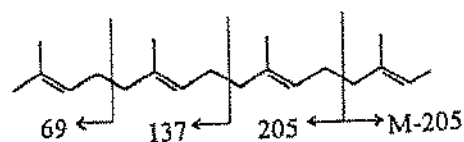
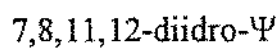
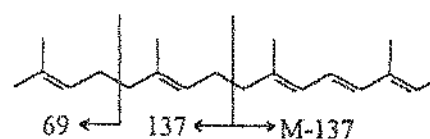
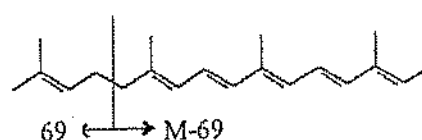
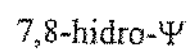
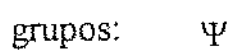
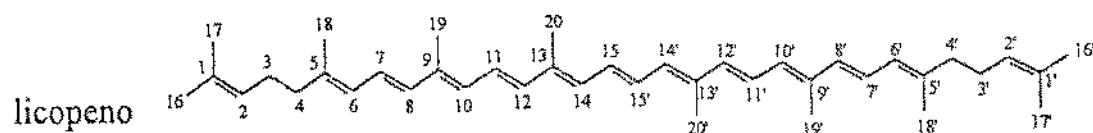
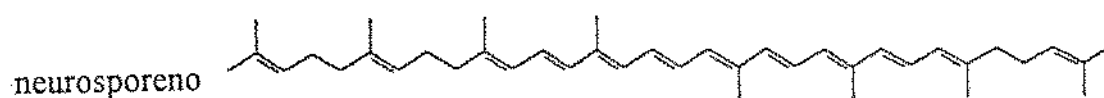
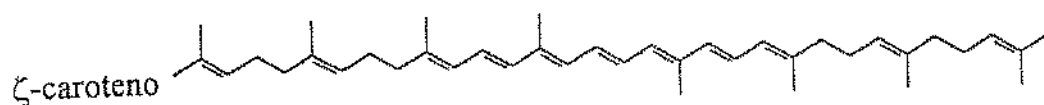
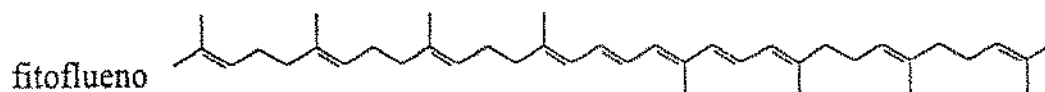
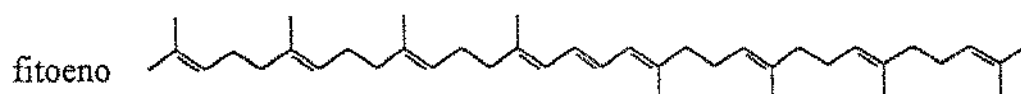


FIGURA 3: Estruturas de carotenos acíclicos e suas fragmentações características.

A maioria dos grupos terminais cíclicos (designados β - e ϵ -) é estável e os carotenóides que os contêm se decompõem por clivagem das ligações da cadeia poliênica (ruptura das ligações 7, 8, 9, 10 e 11), com transferência de um átomo de hidrogênio para o menor fragmento (ENZELL & BROMAN, 1994).

Os grupos terminais com dupla ligação na posição 5,6 dão surgimento a íons característicos de massa alta, predominantemente por clivagens da cadeia poliênica ou eliminação relacionada com a presença de hidroxila (perda de água). Por exemplo, a perda do anel β -ionona no β -caroteno (M-137) ou β -criptoxantina (M-153) (Figura 4) resulta, frequentemente, em um pico de baixa intensidade.

O anel ϵ - (presente no α -caroteno e α -criptoxantina) sofre reação reversa de Diels-Alder (Figura 5), com permanência da carga na cadeia poliênica. Esta reação é característica das estruturas com dupla ligação entre os carbonos 4 e 5, mas os picos correspondentes são geralmente de baixíssima intensidade (VETTER *et alii*, 1971).

Foram estudados, em detalhe, os grupos oxigenados nas posições 5,6 ou 5,8-. Nestes compostos ocorrem reações de eliminação da cadeia poliênica, com formação dos íons $[M-80]^+$ e $[M-106]^+$, além de ocorrer abundante produção de íons de massa baixa, $[164+R]^+$ e $[204+R]^+$ (Figura 6), contendo o anel epóxido e parte da cadeia poliênica. Ocorre também geração de íons de massa alta, que retém o grupo epóxido, como o $[336+R-H]^+$. Os diepóxi-5,6,5',6'- ou 5,8,5',8'-carotenóides sofrem eliminações sucessivas de 80 u.m..

Algumas técnicas novas de ionização como bombardeamento rápido de átomos e ionização química têm sido ultimamente aplicadas. A combinação CLAE-EM está começando a ser explorada (ENZELL & BROMAN, 1994).

3.3.3. Aplicações em alimentos

Os poucos trabalhos que aplicaram EM aos carotenóides em alimentos usaram impacto de elétrons como método de ionização, com exceção de KHACHIK *et alii* (1989, 1992) que empregaram espectrometria de massas de captura de elétrons - modo negativo (com metano) ou desorção química com amônia, cujos espectros de massas apresentaram fragmentação reduzida ou praticamente inexistente. Em 1989, estes autores identificaram β -criptoxantina, ζ -caroteno, fitoflueno e fitoeno em pêssego, e γ -caroteno em damasco. Em pasta de tomate foram identificados 1,2-epóxi-licopeno, 5,6-epóxi-licopeno, licopeno, luteína, 5,6-diidroxi-5,6-diidrolicopeno, 3,4-dideidro-

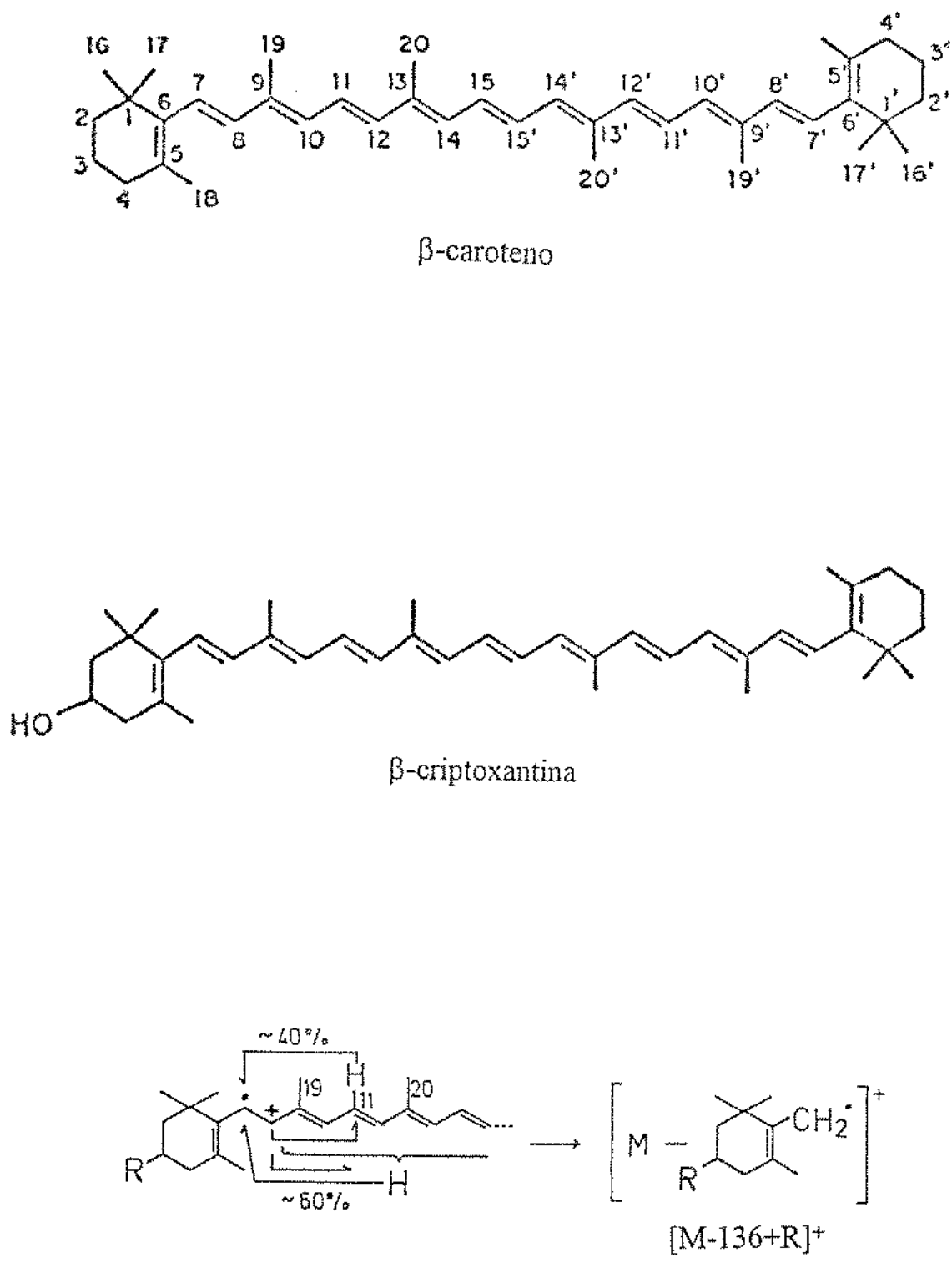
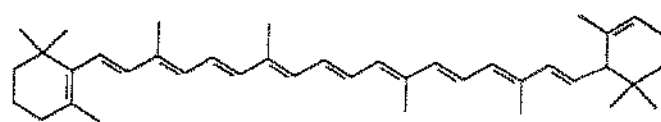
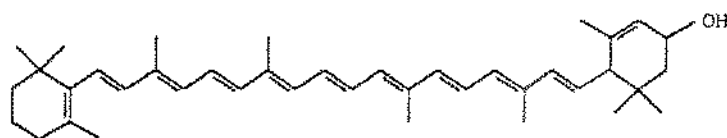


FIGURA 4: Estruturas do β -caroteno e da β -criptoxantina, e formação do fragmento $[M-136+R]^+$.



α -caroteno



α -criptoxantina

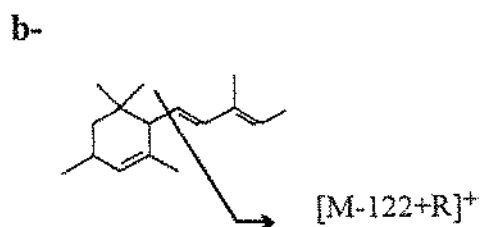
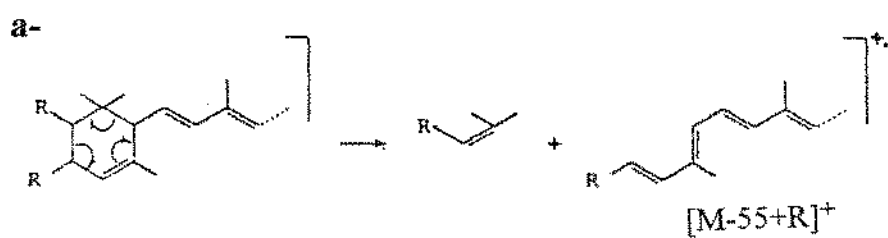


FIGURA 5: Estruturas do α -caroteno e da α -criptoxantina, e formação dos fragmentos **a-** $[M-55+R]^+$ e **b-** $[M-122+R]^+$.

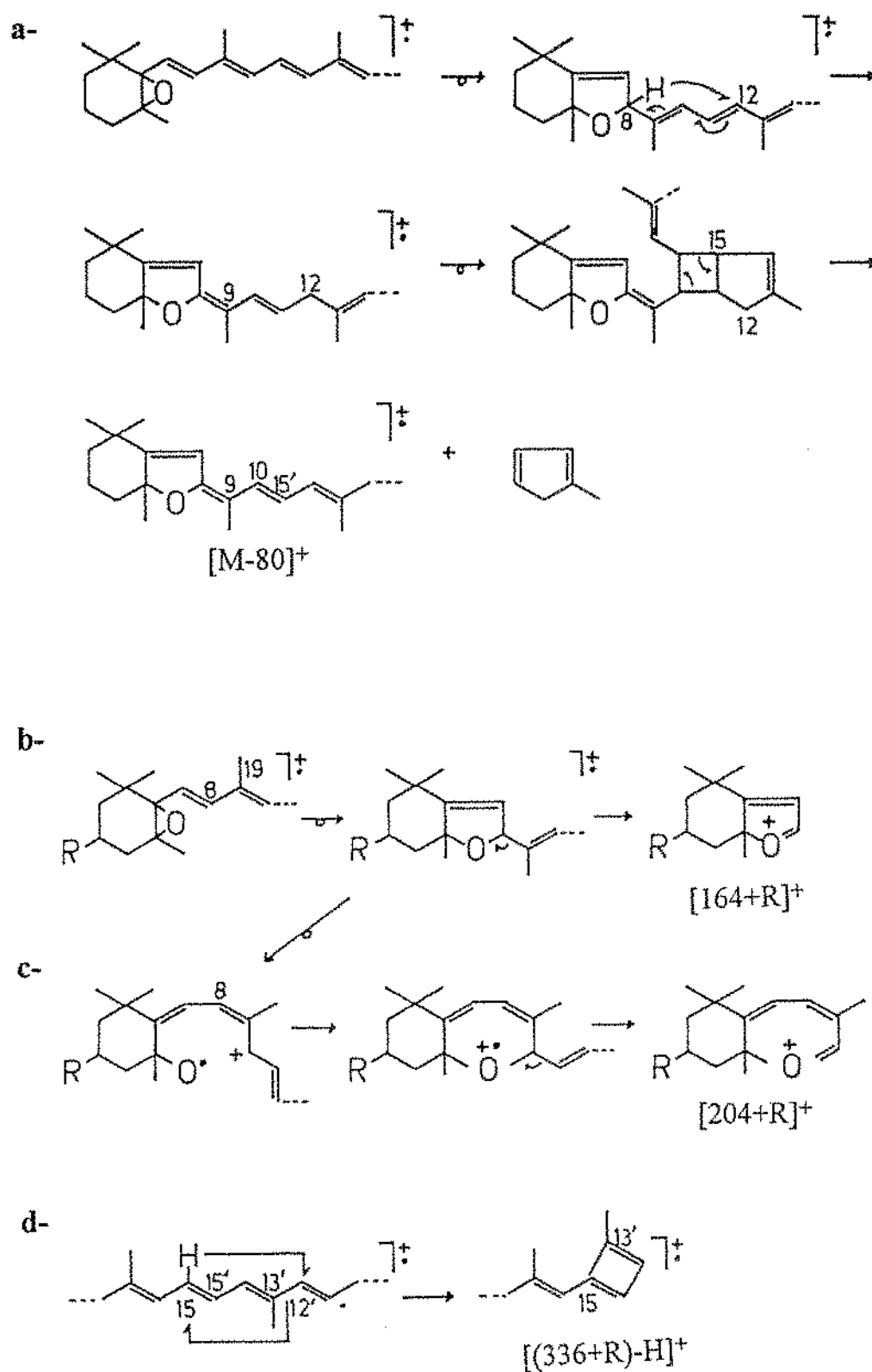


FIGURA 6: Formação dos fragmentos característicos de grupos epóxidos, **a-** $[M-80]^+$, **b-** $[164+R]^+$, **c-** $[204+R]^+$ e **d-** $[(336+R)-H]^+$.

5,6,5',6'-diepóxi-5,6,5',6'-tetraidro- ψ,ψ -caroteno, e além desses, neoxantina, violaxantina e epóxi-luteína em tomate "in natura" (KHACHIK *et alii*, 1992).

KHACHIK *et alii* (1986), utilizando impacto de elétrons, confirmaram a estrutura de neoxantina, violaxantina, epóxi-luteína e luteína em brócolis.

Os carotenóides de laranja foram estudados através de EM por vários grupos. Carotenóides com grupos cetônicos, semi- β -carotenona e β -carotenona, foram isolados e confirmados em *Murraya exotica* e *Triphasia trifolia*, respectivamente (YOKOYAMA & WHITE, 1968). GROSS *et alii* (1975) identificaram os seguintes carotenóides em suco de laranja: β -citraurina, 3-hidróxi-5,8-epóxi-5,8-diidro- β -apo-8'-carotenal, mutatoxantina, 5,6-diidro- β,β -caroteno-3,3',5,6-tetrol e 5,8-epóxi-5,8,5',6',-tetraidro- β,β -caroteno-3,3',5',6'-tetrol. Logo depois, LEUENBERGER & STEWART (1976) confirmaram a presença de β -apo-8'-carotenal, que foi também encontrado posteriormente por FARIN *et alii* (1983) em híbrido de laranja mandarim. PFANDER *et alii* (1980) confirmaram a estrutura do β -apo-8'-carotenal e da β -citraurina.

Reticulaxantina, isolada e identificada por CURL (1962) e STEWART & WHEATON (1971) em laranja, revelou ser, de fato, um artefato formado durante o isolamento dos carotenóides (STEWART & WHEATON, 1973). Durante a saponificação na presença de acetona ocorre a condensação aldólica, resultando na conversão de β -citraurina em reticulaxantina.

Novos epóxidos de carotenos alifáticos, presentes em traços, em tomate e em seu mutante delta tiveram sua estrutura elucidada por EM pelo grupo de BRITTON & GOODWIN: 1,2-epóxi-fitoeno (BRITTON & GOODWIN, 1969), 1,2-epóxi-fitoflueno, 1',2'-epóxi-fitoflueno, 1,2-epóxi- ζ -caroteno, 1,2-epóxi-licopeno, 5,6-epóxi-licopeno (BEN-AZIZ *et alii*, 1973), 1',2'-epóxi- γ -caroteno e 1',2'-epóxi- δ -caroteno (BRITTON & GOODWIN, 1975). Além desses epóxidos foram encontrados mutatocromo, apo-6'-licopenal, apo-8'-licopenal e licoxantina (BEN-AZIZ *et alii*, 1973).

FRECKNALL & PATTENDEN (1984) confirmaram os carotenos presentes em seis mutantes coloridos de tomate, com auxílio de EM e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para verificar a forma geométrica. Em tomate amarelo foi relatada a presença de *trans*- β -caroteno (principal carotenóide), α -caroteno e fitoflueno e no mutante tangerina a presença de *cis*-fitoflueno, di-*cis*- ζ -caroteno, tri-*cis*-neurosporeno e tetra-*cis*-licopeno (conhecido como prolicopeno), sendo estes três

últimos os majoritários. Em tomate mutantes damasco e laranja, foi identificado *trans*- β -caroteno (principal) e no delta *trans*- δ -caroteno (majoritário), *trans*-fitoflueno, ζ -caroteno, 15-*cis*-fitoflueno e *trans*-licopeno.

GROSS *et alii* (1973a) identificaram 22 carotenóides em polpa e casca de abacate, utilizando EM só para neocromo e minulaxantina. Em 1974, foram identificados mais dois carotenóides por EM: crisantemaxantina e 5,8-epóxi-5,8-diidro-10'-apo- β -caroten-3,10'-diol (GROSS *et alii*, 1974). Um carotenóide, semelhante ao presente no abacate, foi encontrado em casca de maçã vermelha e sua estrutura confirmada como sendo o 5,6-epóxi-5,6-diidro-10'-apo- β -caroteno-3,10'-diol (GROSS *et alii*, 1978).

Três novos epóxicarotenóides com 25 carbonos encontrados em ameixa cv. Sagiv tiveram suas estruturas elucidadas por GROSS & ECKHARDT (1981): persicaxantina, persicacromo e apo-12'-violaxantal. Estes pigmentos já haviam sido isolados e tentativamente identificados por CURL (1959, 1960, 1964) em damasco, pêssago, laranja e "cranberry".

Continuando os estudos com frutas, GROSS *et alii* (1973b) identificaram 23 carotenóides em nêspira, sendo que os seguintes foram confirmados por EM: mutatocromo, γ -caroteno, mono- e diepóxido de criptoxantina, criptoflavina, luteína e neoxantina. Foram identificados 10 carotenóides em carambola e destes, 4 foram confirmados por EM: ζ -caroteno, criptoflavina, criptocromo e mutatoxantina (GROSS *et alii*, 1983).

Com o auxílio de EM, BUCHECKER *et alii* (1975) provaram que trolixantina, encontrada em laranja e tangerina (CURL & BAILEY, 1954, 1956, 1957) e em pêssago e damasco (CURL, 1959, 1960), e troliflor, detectada em tomate e pimentão vermelho (CURL, 1961, 1962), são na verdade *trans*-neoxantina.

Em estudos com frutas vermelhas de *Solanum dulcamara* (MARKHAM & LIAAEN-JENSEN, 1968), foram elucidadas as estruturas de licoxantina e licofil e em *Shepherdia Canadensis* (KJØSEN & LIAAEN-JENSEN, 1969), metil-apo-6'-licopenoato.

Lactucaxantina, um novo carotenóide isolado de alface, teve sua estrutura estabelecida por SIEFERMANN-HARMS *et alii* (1981). Este carotenóide foi encontrado em alguns gêneros (*Lactuca*, *Prenanthes*, *Cicerbita* e *Mycelis*) do grupo *Cichorium*, mas em nenhum do grupo *Sonchus*.

MATSUNO *et alii* (1986) isolaram e elucidaram a estrutura de dois novos carotenóides de abóbora: cucurbixantina A e cucurbixantina B. DELI *et alii* (1992) relataram a presença de 58 carotenóides em páprica preta e identificaram por EM cucurbixantina B e mutatoxantina.

A importância da elucidação de estruturas foi também exemplificada com o monoepóxido da β -criptoxantina encontrado em papaya. Dependendo da localização do grupo epóxido este carotenóide poderia ou não ser provitamina A. A estrutura foi estabelecida por EM e RMN como 5,6-epóxi-5,6-diidro- β,β -caroten-3-ol (GODOY *et alii*, 1990). Como os grupos hidrofílico e epóxido estão localizados no mesmo anel, deixando o outro sem substituintes, metade da molécula preenche o requisito estrutural de uma provitamina A.

3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Muitos autores vem se dedicando para estabelecer uma metodologia adequada, utilizando CLAE, para a determinação de carotenóides. No entanto, ainda existem controvérsias em consequência da composição complexa e diversificada dos carotenóides em alimentos. Por isso, apesar das afirmações contrárias, a CLAE não pode ainda ser considerada uma metodologia bem estabelecida e de uso rotineiro para a determinação desses compostos.

3.4.1. Extração e saponificação

O modo de extração e o solvente escolhido devem sempre considerar o tipo de amostra devido à diferente distribuição e ocorrência dos carotenóides nos diferentes alimentos.

Os solventes orgânicos miscíveis com a água são os mais indicados para a extração dos carotenóides porque a grande maioria das amostras "in natura" possuem alta porcentagem de água (DAVIES, 1976).

Muitos autores utilizaram acetona para a extração de carotenóides em vegetais verdes (ESKINS *et alii*, 1977; IRIYAMA *et alii*, 1978; BRAUMANN & GRIMME, 1981; TAKAGI, 1985), em páprica (FISHER & KOCIS, 1987) e em pimenta

vermelha (ALMELA *et alii*, 1991). Combinações de acetona-etanol (1:1) e acetona-hexano (9:1) foram empregadas na extração de carotenóides de cenoura (PETTERSON & JONSSON, 1990) e de diversos vegetais e frutas (SCHWARTZ & PATRONI-KILLAM, 1985), respectivamente. PHILIP *et alii* (1988, 1989) empregaram extração com metanol seguido de acetona. Para prevenir a perda por oxidação dos carotenóides durante a análise, foram adicionados antioxidantes como ascorbato de sódio (VAL *et alii*, 1986) e hidroxibutiltolueno (BHT) (HEINONEN *et alii*, 1989). Agentes neutralizantes (como carbonato de sódio) foram empregados para evitar a conversão de clorofila em feofitina durante a extração com acetona (CANO, 1991; CANO & MARÍN, 1992; YAMAUCHI & WATADA, 1993).

Metanol (TAYLOR & MCDOWELL, 1991) e combinações desse solvente com clorofórmio (QUACKENBUSH, 1987) e com tetracloreto de carbono (DAOOD *et alii*, 1987, 1989) foram também utilizados na extração. Cabe ressaltar que a extração de carotenóides com metanol e carbonato de cálcio em pimenta amarela (MATUS *et alii*, 1991) e preta (DELI *et alii*, 1992) durou 42 horas.

A grande vantagem da extração com tetraidrofurano, $MgCO_3$ e Na_2SO_4 anidro, empregada pela primeira vez por BUSHWAY & WILSON (1982), foi a não inclusão da etapa de partição. Apesar do tetraidrofurano ser relativamente caro, tóxico e propenso à acumulação de peróxidos, necessitando de estabilização, esta extração foi empregada em diversos estudos (BUSHWAY, 1985, 1986; KHACHIK *et alii*, 1986, 1988; BUREAU & BUSHWAY, 1986; MEJIA *et alii*, 1988; ABDEL-KADER, 1991; GRANADO *et alii*, 1992).

Somente em dois trabalhos (SPEEK *et alii*, 1986; HOMNAVA *et alii*, 1990) utilizou-se primeiro a saponificação e depois a extração, caminho normalmente seguido na determinação de vitamina A.

Extração com CO_2 supercrítico começou a ser empregada na área de carotenóides (DEGNAN *et alii*, 1991) por ser seletiva, executada à baixa temperatura, e não usar grandes quantidades de solventes orgânicos.

A extração quantitativa envolve, normalmente, sucessivas operações até a retirada completa dos pigmentos. A seguir realiza-se uma etapa de partição, e, opcionalmente uma saponificação do extrato.

A saponificação tem como objetivos hidrolisar os ésteres de xantofilas e remover lipídeos e clorofilas que possam interferir na análise posterior (DAVIES,

1976). Esta técnica consiste basicamente na adição de KOH ou NaOH metanólicos ou aquosos ao extrato de carotenóides dissolvido em éter de petróleo ou hexano, podendo ser realizada a quente ou à temperatura ambiente. Diferentes concentrações de álcali, tempo e temperatura vêm sendo empregados.

BUSHWAY & WILSON (1982) relataram que não ter havido diferença nos teores de α - e β -caroteno entre amostras saponificadas (condições não especificadas) e não saponificadas. Entretanto, KHACHIK *et alii* (1986) reportaram perda de 6% de β -caroteno e de 17 a 84% de xantofilas em brócolis, após saponificação com 30% de KOH metanólico, à temperatura ambiente.

Vários autores excluíram a etapa de saponificação, visando evitar a degradação e diminuir o tempo de análise, desenvolvendo métodos para a separação dos ésteres de diversas frutas como abóbora (KHACHIK & BEECHER, 1988), pêssego (KHACHIK *et alii*, 1989), páprica (GREGORY *et alii*, 1987; SCALIA & FRANCIS, 1989), suco de laranja (PHILIP *et alii*, 1988), caqui e mamão (PHILIP & CHEN, 1988a).

3.4.2. Separação

Apesar da possibilidade da CLAE proporcionar alta resolução e melhor reprodutibilidade do que a cromatografia em coluna clássica (RUEDI, 1985), nenhum método desenvolvido até o momento foi capaz de promover a separação completa dos carotenóides e suas respectivas formas isoméricas em uma mesma corrida. Deste modo, a análise dos carotenóides seguiu duas abordagens: determinação de β -caroteno em suas formas isoméricas e determinação da composição dos carotenóides sem separação dos isômeros geométricos.

As primeiras tentativas para a separação de isômeros por CLAE foram feitas empregando colunas de alumina (VECCHI *et alii*, 1981) ou de hidróxido de cálcio (TSUKIDA *et alii*, 1982; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987, 1988). A resolução obtida foi considerada muito boa, mas essas colunas não estão disponíveis comercialmente e requerem o controle estrito de uma série de condições.

Procurando uma alternativa mais prática para a separação das formas *cis*, QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) testaram mais de 20 colunas comerciais de fase reversa (C_8 e C_{18}), e somente em 3 colunas poliméricas (marca Vydac) foi obtida a separação dos isômeros de β -caroteno. BUSHWAY (1985) já havia verificado a eficácia deste tipo de coluna na separação de isômeros. Mais tarde, CRAFT *et alii*

(1990) também escolheram a coluna Vydac para a separação de isômeros de padrões comerciais de β -caroteno. As fases móveis utilizadas nestes três trabalhos foram combinações de metanol com clorofórmio ou com água, sempre de modo isocrático.

A maioria dos trabalhos visando a determinação da composição de carotenóides também utiliza colunas de fase reversa (C_{18}), onde ocorrem ligações mais fracas com os pigmentos, evitando a sua degradação.

BUSHWAY (1985) testou, além de várias colunas de fase reversa, duas de fase normal (amino e alumina), para separar uma mistura de padrões e α - e β -caroteno em batata doce, tomate e couve. A fase móvel utilizada nestas duas colunas foi 99,5% isooctano e 0,5% de tetraidrofurano estabilizado, não ocorrendo eluição dos carotenóides mais polares (criptoxantina e cantaxantina). Além disso, na coluna de amino, α - e β -caroteno coeluíram e na de alumina, o γ -caroteno não eluiu, embora tenha havido separação entre o α - e β -caroteno.

Utilizando coluna de sílica e gradiente de acetona em éter de petróleo como fase móvel, ALMELA *et alii* (1990, 1991) separaram 16 carotenóides em páprica e em vários cultivares de pimenta vermelha. TAKAGI (1985) também empregou coluna de sílica para separar os carotenóides de diversas folhas, com gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel. De acordo com BRAUMANN & GRIMME (1981), no entanto, a sílica deve ser evitada porque leva à degradação dos carotenóides.

A coluna de ciano ainda não foi empregada em amostras alimentícias. GILLAN & JOHNS (1983) utilizaram esta coluna, como uma alternativa ao uso de sílica, para separar carotenóides de bactérias. Foi também empregada, mais recentemente, por KHACHIK *et alii* (1993) para determinar a composição de carotenóides em soro.

KHACHIK *et alii* (1986, 1988, 1989, 1992) determinaram a composição de carotenóides em várias amostras como vegetais verdes, tomate, damasco, melão, "grapefruit" rosa e abóbora, incluindo nessa última os ésteres de xantofilas. Foram empregadas duas colunas de C_{18} de marcas diferentes, com gradientes de metanol, acetonitrila, tetraidrofurano e hexano adaptado a cada tipo de amostra. A corrida durou cerca de 50 minutos. HEINONEN *et alii* (1989) utilizaram também este mesmo gradiente para a determinação de carotenóides majoritários em vários vegetais e frutas consumidos na Finlândia.

GRANADO *et alii* (1992) usaram metanol, acetonitrila e diclorometano, de forma isocrática, para verificar a composição de carotenóides em folhas verdes e

alguns vegetais e frutas porém não mencionaram a presença de neoxantina e violaxantina, apesar de todos os trabalhos desenvolvidos com folhas terem detectado estes carotenóides em folhas. Em proporções diferentes, SIMON & WOLFF (1987) também utilizaram estes mesmos solventes para separar os carotenóides em cenoura liofilizada.

PHILIP & CHEN (1988b) utilizaram gradiente de metanol e acetato de etila para obter a separação de carotenóides e seus ésteres. A corrida levou cerca de 15 minutos, mas o cromatograma mostrou uma separação pobre. Gradiente de metanol, água e acetato de etila foi empregado por CANO (1991) para separar os carotenóides de kiwi em 12 minutos. Com este gradiente houve separação entre algumas formas isoméricas de violaxantina e luteína, mas não de β -caroteno.

Um exemplo interessante da evolução na separação é o caso de folhas verdes onde se observa um aumento no número de carotenóides separados e uma diminuição no tempo de corrida de 100 (ESKINS *et alii*, 1977) para 18 minutos (BRAUMANN & GRIMME, 1981).

A reprodutibilidade da separação obtida é difícil, mesmo usando colunas da mesma marca. SCOTT (1992) obteve diferentes respostas de área, tempo de eluição e perfis dos picos minoritários (vizinhos aos majoritários) utilizando três colunas da mesma marca, mas de diferentes bateladas. Este mesmo autor (SCOTT & HART, 1993) reportou, ainda, redução de 1 minuto no tempo de corrida a cada aumento de 1°C na temperatura.

É importante salientar que em nenhum destes trabalhos houve separação boa ou suficiente para quantificar todos os carotenóides, e muito menos seus isômeros *cis*.

3.4.3. Identificação

Tempo de retenção, às vezes complementado por co-cromatografia e pelo espectro no visível, foi utilizado para a identificação de carotenóides na maioria dos trabalhos (ESKINS *et alii*, 1977; SIMON & WOLFF, 1987; DAOOD *et alii* 1987, 1989; NG & TAN, 1988; BLACS *et alii*, 1989; HEINONEN *et alii*, 1989; TAYLOR & McDOWELL, 1991; ROUSEFF *et alii*, 1992; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et alii*, 1992; GRANADO *et alii*, 1992). Segundo TAYLOR & McDOWELL (1991), estes parâmetros fornecem informações limitadas, impossibilitando a identificação conclusiva de vários carotenóides.

Para colaborar na identificação dos carotenóides, além dos parâmetros citados acima, duas reações químicas foram utilizadas, a redução com boroidreto de sódio (MATUS *et alii* 1981; BARANYAI *et alii*, 1982; FISHER & KOCIS, 1987; DELI *et alii*, 1992) e o rearranjo epóxido-furanóxido pela adição de HCl (MATUS *et alii* 1981; BRAUMANN & GRIMME, 1981; CANO, 1991) ou por adição de ácido tolueno sulfônico (FISHER & KOCIS, 1987).

KHACHIK *et alii* (1986, 1992) utilizaram além dos parâmetros tradicionais, EM para identificar os carotenóides de vegetais verdes e tomate, mas somente nas frações presentes em maior quantidade.

3.4.4. Quantificação

A primeira grande dificuldade para a quantificação de carotenóides por CLAE é a existência de poucos padrões comerciais e a pureza variada dos disponíveis. QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) encontraram em padrões comerciais de *trans*- β -caroteno porcentagens deste composto variando de 0,6 a 88,7% em diferentes marcas e variações de 23,4 a 81,0% em uma mesma marca. CRAFT *et alii* (1990) também observaram que a pureza de padrão de β -caroteno proveniente de quatro fornecedores variou de 7,1 a 82,9%. Outro problema verificado por THOMPSON (1986), QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) é a rápida degradação dos padrões após abertura da embalagem selada.

Diante destes fatos, CRAFT *et alii* (1990) deixaram claro que especiais precauções, como por exemplo purificação dos padrões imediatamente antes da análise, devem ser tomadas para a obtenção e construção das curvas de calibração. RODRIGUEZ-AMAYA (1989) já havia também recomendado, para efeito de quantificação, o uso de soluções recentemente preparadas e testadas espectrofotometricamente.

Os padrões dos demais carotenóides, que não são comercializados, devem ser obtidos de fontes naturais e purificados em coluna clássica aberta e/ou CCD, coletados após várias corridas em CLAE ou preferencialmente isolados através de coluna preparativa em CLAE (ISAKEN & FRANCIS, 1989).

Tendo em vista que a execução diária destas operações torna a análise longa, complicada e às vezes inviável, vários estudos têm recorrido à quantificação por

padronização interna utilizando diversos padrões de carotenóides sintéticos, como o β -apo-8'-carotenal (NOGA & LENZ, 1983; KHACHIK *et alii*, 1986 e SIMON & WOLFF, 1987), cantaxantina (BARANYAI *et alii*, 1982; GREGORY *et alii*, 1987), decapreno- β -caroteno (KHACHIK & BEECHER, 1985) e nonapreno- β -caroteno (KHACHIK & BEECHER, 1987). Contudo, ainda permanecia o problema da estabilidade dos compostos usados como padrão interno, fazendo com que outra alternativa fosse buscada. QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986) foram os primeiros a utilizar na determinação de carotenóides uma solução de Sudan I (1-(fenilazo)-2-naftalenol) como padrão interno. Este corante apresenta solubilidade e λ_{max} similares aos dos carotenóides, além de ser extremamente estável.

Aproveitando a idéia, CARVALHO *et alii* (1992) também usaram Sudan I como padrão interno para a quantificação de provitaminas A em diversos alimentos. O grande inconveniente encontrado foi a sobreposição do tempo de retenção do Sudan I com os da clorofila e xantofilas di- e triidroxiladas em coluna de fase reversa (C_{18}). Este problema foi contornado com a passagem prévia dos extratos por uma minicolumna de MgO:Hiflosupercel para reter os interferentes acima citados, o que impede, por outro lado, a utilização de Sudan na quantificação das xantofilas.

Diante das dificuldades expostas acima, não é surpresa que em vários estudos não foi feita quantificação (ESKINS *et alii*, 1977; BRAUMANN & GRIMME, 1981; FISHER & KOCIS, 1987; DAOOD *et alii*, 1987; TAYLOR & McDOWELL, 1991; YAMAUCHI & WATADA, 1993), ou os resultados foram fornecidos em porcentagens relativas (QUACKENBUSH, 1987; CHANDLER & SCHWARTZ, 1987; MATUS *et alii*, 1991; DELI *et alii*, 1992) ou simplesmente em área (mm^2) (DAOOD *et alii*, 1989). Para que os dados possam ser realmente úteis em Ciência de Alimentos, Nutrição e Medicina, as concentrações absolutas dos carotenóides são imprescindíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem e Preparo das Amostras

4.1.1. Para confirmação da identidade de carotenóides por espectrometria de massas

Seis unidades de maracujá (*Passiflora edulis*), variedade flavicarpa, foram adquiridas em Campinas, no estágio maduro, embaladas e enviadas, via aérea, à Inglaterra. Apenas a parte comestível (polpa) foi submetida à análise.

Quatro mangas (*Mangifera indica*) cultivares Keitt e Tommy Atkins, no estágio maduro, foram compradas no comércio de Campinas. A polpa das mangas foi homogeneizada em conjunto.

Como o caruru apresentou o maior teor de α -criptoxantina dentre as várias folhas previamente analisadas no Brasil (RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1990, 1991), essa verdura foi utilizada para a confirmação da estrutura da α -criptoxantina.

O extrato de manga e a fração de α -criptoxantina obtida do caruru foram preparados no Brasil, acondicionados em ampola âmbar, selados sob atmosfera de N_2 e transportados, sem refrigeração, à Inglaterra.

4.1.2. Para determinação da composição quantitativa de carotenóides da manga e do suco de manga

Com o objetivo de estudar a diferença entre cultivares e estágio de maturação, duas cultivares de mangas (*Mangifera indica*), Tommy Atkins e Keitt, foram adquiridas no CEASA - Campinas, em janeiro e fevereiro de 1993, procedentes da região de Araraquara, Estado de São Paulo. Foram analisados três lotes de cada fruta, sendo que em cada lote separou-se os frutos em três diferentes estágios de maturação: verde, entre verde e maduro, e maduro.

Para verificar a influência da localização geográfica, adquiriu-se, também, três lotes de manga Keitt, procedente de Juazeiro - Bahia. Somente o estágio maduro foi analisado.

Três frutos no mesmo estágio de maturação, com cerca de 500 g cada, foram retirados ao acaso de cada lote, homogeneizados em multiprocessador (Walita) e retirada a quantidade necessária (de 15 a 40 g, dependendo do estágio de maturação) para análise por CLAE.

Foram também comprados no comércio de Campinas três diferentes marcas de suco de manga. De cada marca foram analisados 3 lotes, sendo cada lote constituído de 3 garrafas tomadas ao acaso. Após homogeneização do conteúdo das três garrafas de cada lote, foram retiradas alíquotas de 30 a 35 g de suco para análise por CLAE.

4.1.3. Para verificação da incidência de carotenóides minoritários provitamínicos A em folhas

As seguintes verduras folhosas foram compradas no comércio de Campinas e imediatamente levadas ao laboratório para análise: alface crespa e lisa (*Lactuca sativa*), caruru (*Amaranthus viridis*), couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), taioba (*Xanthosoma* spp.), agrião (*Nastrutium officinale*), salsinha (*Petroselinum hortense*), rúcula (*Eruca sativa*), almeirão (*Chicorium intybus*), chicória (*Chicorium endivia*) e espinafre (*Spinacea oleracea*). Cada maço de folha foi triturado separadamente em multiprocessador (Walita) e retirada a quantidade necessária de amostra para análise por CLAE (aproximadamente 5 g).

4.2. Etapas Pré-Cromatográficas

As etapas de extração e saponificação foram executadas de acordo com o método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988).

4.2.1. Obtenção do extrato de carotenóides para espectrometria de massas

A Figura 7 apresenta o esquema das etapas para obtenção dos extratos de manga, maracujá e caruru para a confirmação da identidade de carotenóides por espectrometria de massas. Neste procedimento teve-se o cuidado de não utilizar material plástico, papel de filtro, nem homogeneizador.

4.2.2. Obtenção do extrato de carotenóides da manga e do seu suco para quantificação

O esquema das etapas pré-cromatográficas que foi utilizado para análise quantitativa de manga e suco de manga encontra-se na Figura 8.

4.3. Etapas Cromatográficas

4.3.1. Isolamento dos carotenóides para posterior análise por espectrometria de massas

4.3.1.1. Cuidados necessários

Quando pequenas quantidades de carotenóides (da ordem de poucas μg) estão sendo preparadas para espectrometria de massas, muitas impurezas, decorrentes da amostra, dos solventes e fases estacionárias, podem ser introduzidas durante as etapas de purificação. Além disso, os plastificantes, principalmente ftalatos, mesmo em pequenas quantidades são rapidamente dissolvidos por solventes orgânicos, podendo ser uma causa grave de contaminação (BIEMANN, 1962; BRITTON & YOUNG, 1993).

Para prevenir a contaminação dos carotenóides durante as etapas de isolamento, não foram usadas garrafas e pissetas plásticas, e a água destilada foi recolhida em recipiente de vidro. Além disso, todos os solventes grau p.a. foram destilados, e os peróxidos removidos do EE (éter etílico) pela adição de ferro reduzido antes da destilação. O EE, assim purificado, foi utilizado dentro de cinco dias, principalmente para as etapas finais de purificação dos carotenóides.

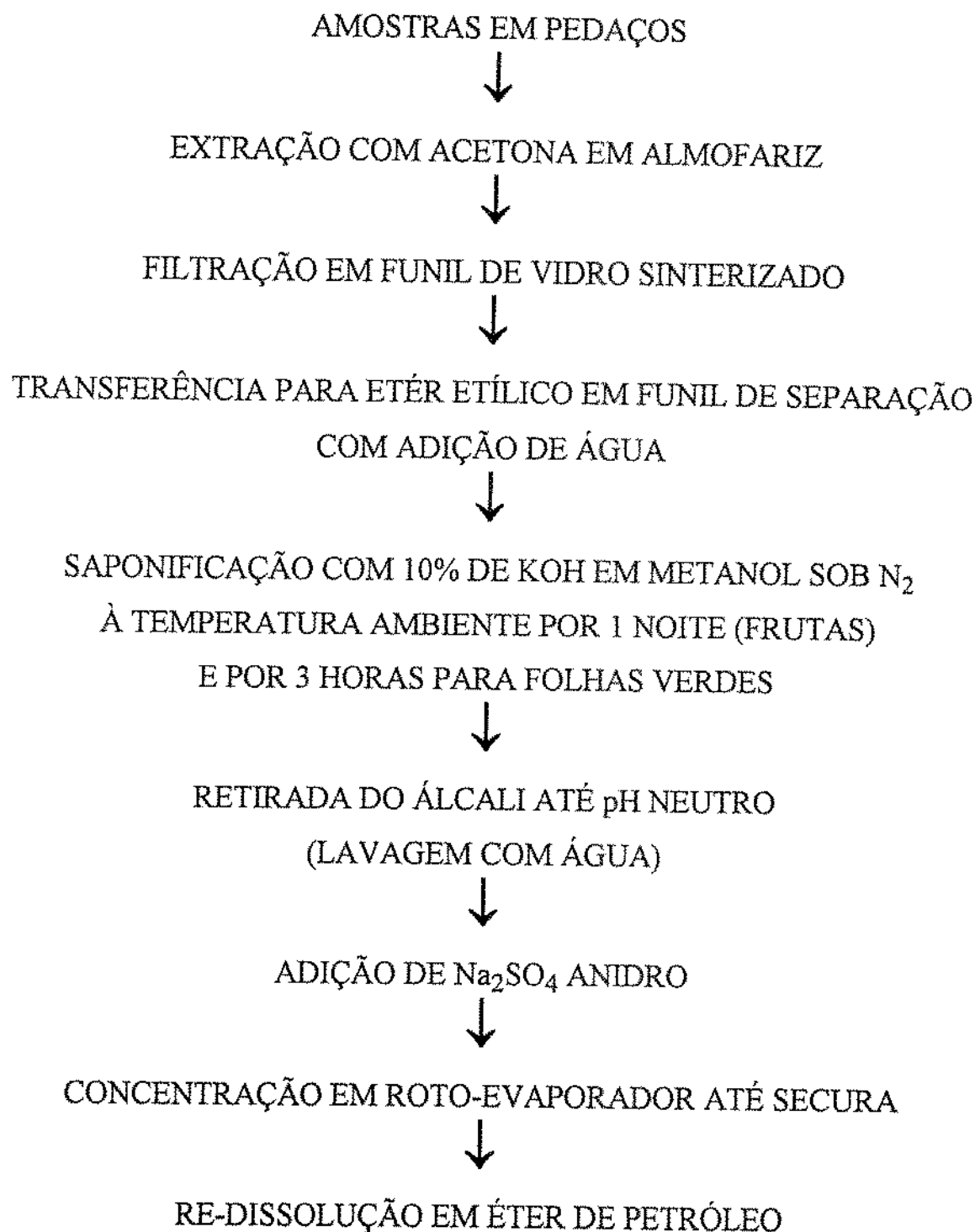


FIGURA 7: Esquema das etapas pré-cromatográficas utilizadas em conjunto com espectrometria de massas.

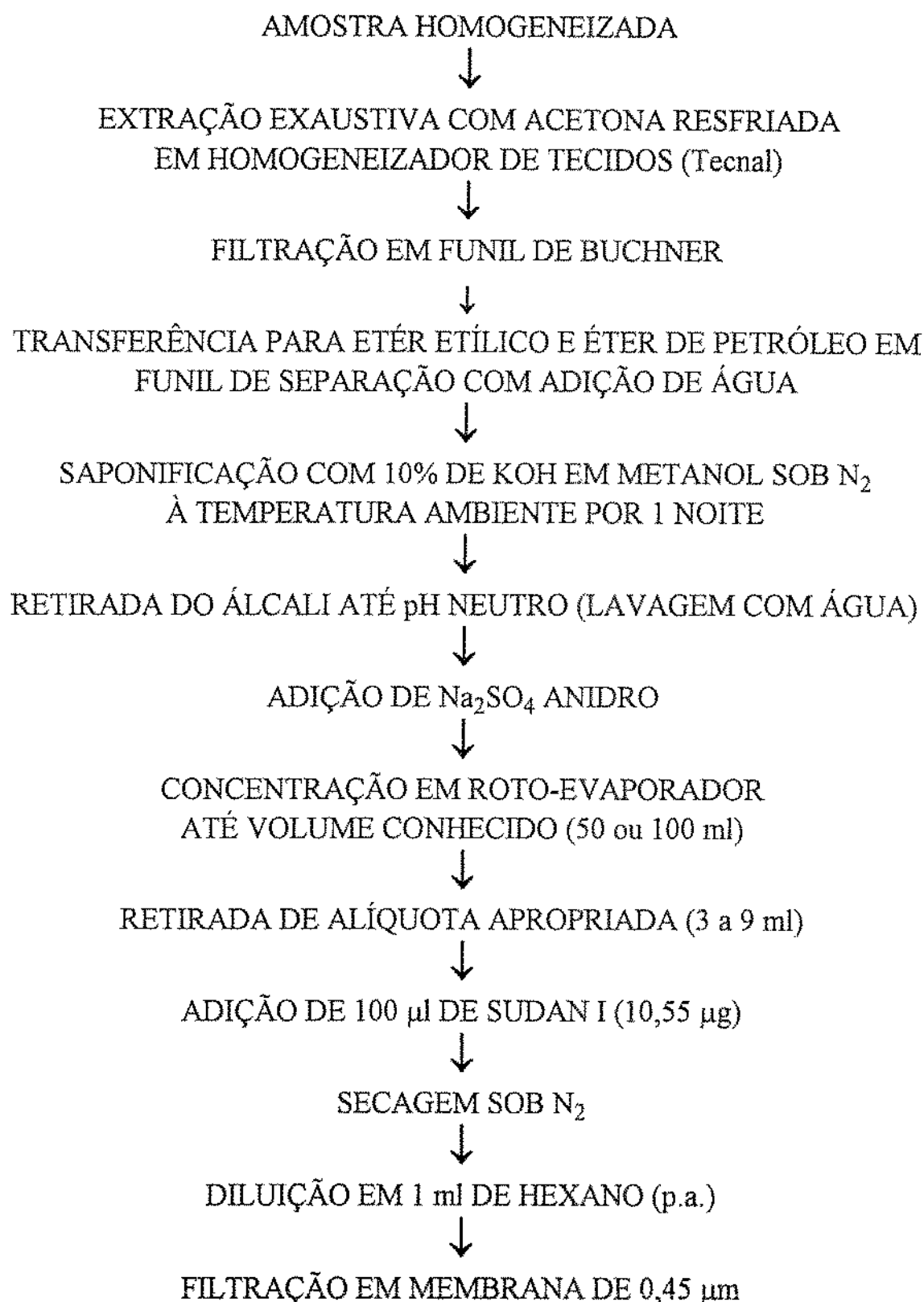


FIGURA 8: Esquema das etapas pré-cromatográficas utilizadas para posterior quantificação por CLAE.

Todas as vidrarias foram rigorosamente limpas com acetona e água quente; adicionalmente, as pipetas Pasteur e ampolas foram enxaguadas com EE destilado.

Para evitar a introdução de contaminantes durante as etapas de purificação, as placas de sílica para cromatografia em camada delgada foram previamente corridas com um solvente mais polar (normalmente éter etílico) que o utilizado para a separação dos carotenóides. Todos os solventes empregados na última etapa de purificação, além de destilados, foram purificados em coluna de alumina (grau I).

4.3.1.2. Preparação das fases estacionárias

Segundo especificação do fabricante, alumina neutra grau I (Woelm-Eschwege ou Merck) foi levada a grau III ou entre III e IV com a adição de água à alumina previamente submersa em EP (éter de petróleo), agitando-se por 2 a 3 minutos para que houvesse incorporação homogênea de água por toda a superfície da alumina. Esta suspensão foi utilizada como fase estacionária em coluna clássica de vidro, bem como para preparar mini-colunas em pipeta Pasteur.

Todas as placas cromatográficas, confeccionadas no laboratório, foram com espessura de 0,5 mm. As placas de sílica (Merck) e sílica básica (preparada pela adição de uma pastilha de KOH à água de suspensão da sílica) foram ativadas por 2 h a 120°C. Placas prontas (Merck), com espessura de 0,25 mm, também foram empregadas.

Para a preparação das placas de óxido de magnésio, misturou-se em almofariz quantidades iguais de MgO (BDH Laboratory Supplies) e terra diatomácea "kieselguhr G" (Merck) (para 5 placas: 17,5 g de cada adsorvente e 60 ml de água). As placas a serem utilizadas até o dia seguinte de sua preparação foram ativadas por 30 minutos a 120°C e as demais por 1 h a 120°C.

4.3.1.3. Separação dos carotenóides da manga e do caruru

Para a separação das frações desejadas, utilizou-se uma coluna de vidro, empacotada à vácuo com MgO (Merck):Hiflosupercel (Johns-Manville) (1:2) até a altura de cerca de 10 cm. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi

adicionada ao topo da coluna para reter a água que ainda estivesse presente na amostra.

A coluna foi molhada com EP e, após aplicação da amostra, eluída com EP e 5% de EE em EP para retirada do β -caroteno. Para a eluição das xantofilas de manga utilizou-se 100% de acetona e 10 a 30% de água em acetona. α -Criptoxantina do caruru foi retirada com 10 a 30% de EE em EP, garantindo desse modo sua completa eluição.

A fração contendo as xantofilas de manga foi concentrada até secura e redissolvida em pequeno volume de hexano (Lichrosolv, Merck). As xantofilas foram a seguir separadas por CLAE em coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel, segundo detalhes descritos no item 4.3.3.1. Os pigmentos isolados foram acumulados durante 5 corridas.

Os carotenóides da manga (frações de β -caroteno, β -criptoxantina, violaxantina e neoxantina) e a fração do caruru contendo α -criptoxantina foram concentrados até secura sob N_2 e estocados a $-10^\circ C$ em ampolas âmbar seladas em atmosfera de N_2 .

Como as ampolas foram transportadas à Inglaterra sem refrigeração, podendo levar à formação de produtos de degradação, foi necessária a realização de outra etapa cromatográfica. Cada carotenóide foi purificado em camada delgada de sílica (Merck), com as seguintes fases móveis: EP para β -caroteno, EP:EE (3:2) para as criptoxantinas e 100% EE para os di- e triidroxilados. Após separação, a banda principal foi raspada e o carotenóide rapidamente extraído com EE, em funil de vidro sinterizado sob vácuo.

Após a purificação, registrou-se os espectros de absorção dos carotenóides na faixa de comprimento de onda de 350 a 550 nm. Os pigmentos foram concentrados até secura e estocados sob atmosfera de N_2 a $-20^\circ C$ até o momento da análise.

Alternativamente, os carotenóides da manga foram também separados de acordo com o procedimento seguido para maracujá, conforme descrito a seguir.

4.3.1.4. Separação dos carotenóides do maracujá

Com o intuito de separar os carotenóides em 3 grandes grupos, de diferentes polaridades, utilizou-se coluna aberta de alumina neutra (grau III). A fração contendo

carotenos e epóxidos de carotenos foi eluída com EP, a de monoidroxilados e oxocarotenóides com 60 a 90% de EE em EP e a contendo di- e triidroxilados com EE a 30% de etanol em EE (Figura 9).

A fração de carotenos foi a seguir aplicada em placa de sílica, tendo como fase móvel EP. As seis bandas separadas foram raspadas e eluídas com EE. Após leitura em espectrofotômetro, verificou-se que algumas bandas eram misturas de carotenóides. Estas bandas foram então recromatografadas em placas de MgO:kieselguhr G, e as fases móveis utilizadas nesta placa estão apresentadas na Tabela 3. Como o comportamento cromatográfico do mesmo pigmento na placa de MgO podia variar, devido provavelmente à pequenas diferenças na porcentagem de água da placa e/ou ao poder de eluição dos solventes, as porcentagens de acetona em EP foram ajustadas, de modo que o pigmento mais polar percorresse no mínimo 4 cm na placa.

Obteve-se novamente o espectro e os carotenos espectrofotometricamente puros foram concentrados até secura sob fluxo de N_2 e estocados a $-20^\circ C$.

Os carotenóides monoidroxilados foram separados em placa de sílica utilizando-se EE:EP (3:1) como fase móvel. As três bandas obtidas foram eluídas com EE. As etapas subsequentes foram as mesmas descritas para carotenos, sendo que as fases móveis empregadas para CCD de MgO encontram-se na Tabela 3.

A fração contendo di- e triidroxilados foi cromatografada em placa de sílica básica, para evitar o possível rearranjo dos epóxidos 5,6 para 5,8, utilizando-se como fase móvel EE. As cinco bandas obtidas foram eluídas com EE e gotas de acetona. Seguiu-se as mesmas etapas descritas para os carotenos. Os solventes empregados para CCD de MgO encontram-se na Tabela 3.

4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Varian, com sistema ternário de bombeamento de solvente, modelo 9010, e válvula injetora "Rheodyne" com alça de amostra de 10 μl de capacidade. O detector por arranjo de diodos (DAD) Waters, modelo 994, foi acoplado a um integrador-registrador Varian, modelo 4400.

Os cromatogramas foram obtidos a 445 nm e os espectros fornecidos pelo detector entre 300 e 550 nm.

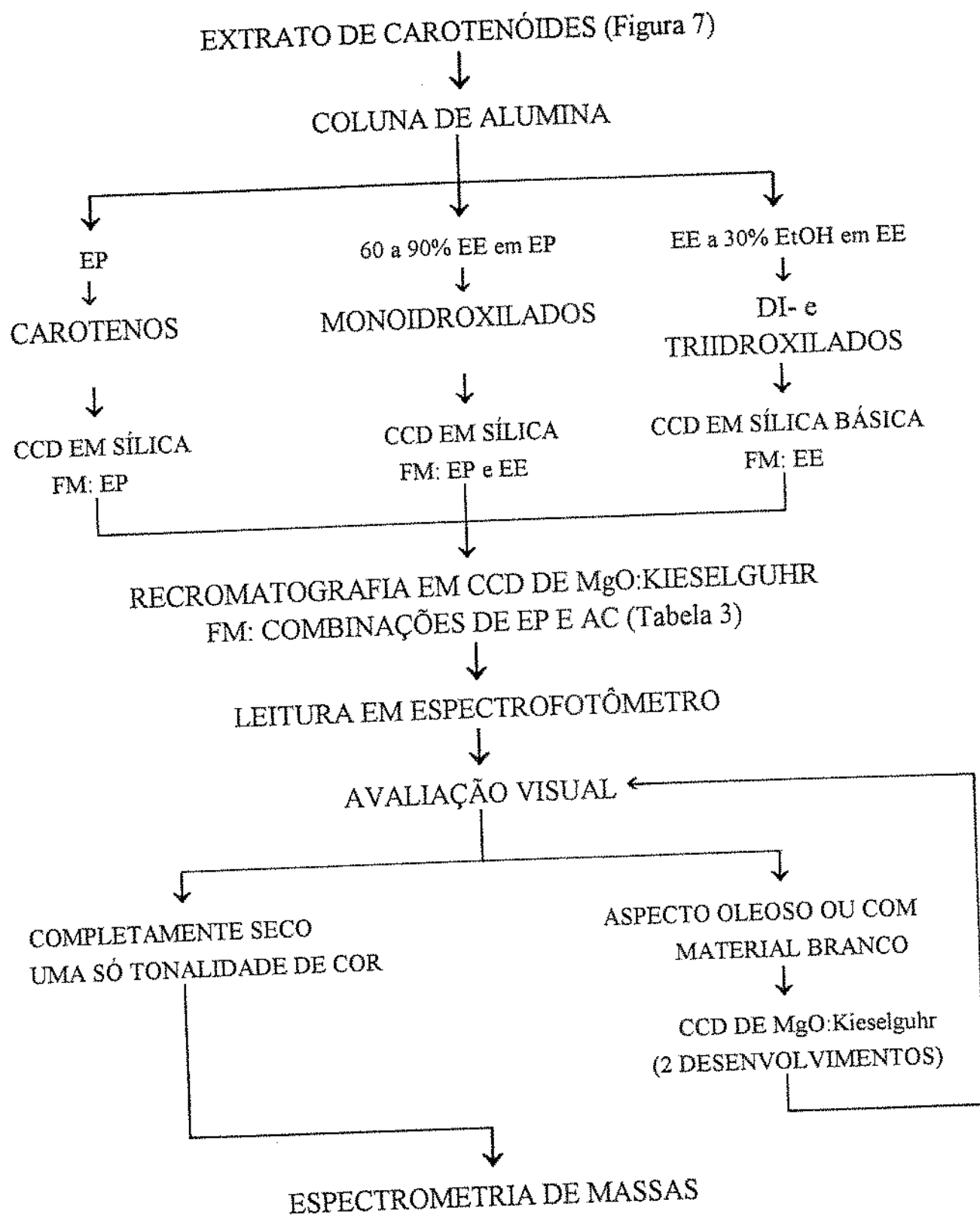


FIGURA 9: Esquema geral de isolamento e purificação de carotenóides para análise por espectrometria de massas.

TABELA 3: Fases móveis empregadas para o desenvolvimento das placas de MgO: kieselguhr.

Banda proveniente da placa de sílica ^a	Fase móvel para a placa de MgO ^b
CAROTENOS	
1 e 2	éter de petróleo
3, 4 e 6	10% de acetona em éter de petróleo
5	40% de acetona em éter de petróleo
MONOIDROXILADOS	
1 e 2	10% de acetona em éter de petróleo
3	15% de acetona em éter de petróleo
POLIIDROXILADOS	
1	40% de acetona em éter de petróleo
2	25% de acetona em éter de petróleo
3	30% de acetona em éter de petróleo

^aNumeração a partir da frente do solvente.

^bPequenas mudanças nas porcentagens dos solventes foram, às vezes, necessárias.

Todos os solventes utilizados, de grau cromatográfico (Lichrosolv - Merck), foram previamente filtrados em sistema Millipore de filtração à vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μm e, a seguir, degaseificados em ultra-som. A água utilizada foi obtida pelo sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore).

Todas as amostras foram filtradas em membrana (Millipore) de 0,45 μm .

4.3.2.1. Manga e suco de manga

Após vários testes com duas colunas de C_{18} de 5 μm , Vydac 201TP54 (250 x 4,6 mm) e Spherisorb ODS-1 (150 x 4,6 mm), e várias combinações de solventes (acetonitrila, metanol, diclorometano e acetato de etila) verificou-se que a separação das xantofilas não era tão boa quanto na coluna de ciano e que o Sudan I eluía com as xantofilas, impossibilitando o seu uso como padrão interno.

Foi então desenvolvido um método utilizando coluna de ciano Spherisorb (Alltech Associates, USA), com partículas de 5 μm , comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 4,6 mm, precedida por coluna de guarda de ciano de 3 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com partículas de 10 μm (Varian). Utilizou-se como fase móvel uma programação multi-linear com concentrações crescentes de acetona em n-hexano de 0 a 15% em 10 minutos, a 20% em 20 minutos, a 30% em 10 min e a 40% em 2 min. O tempo de re-equilíbrio foi de 8 minutos. Usou-se vazão de 1 ml/min, que forneceu uma pressão de 29 atm ao sistema.

4.3.2.2. Maracujá

Como a triagem indicou que o maracujá possui um alto número de carotenos, os primeiros testes foram realizados em coluna de C_{18} de 5 μm , Spherisorb ODS-2 (250 mm x 4,6 mm) (Phase Separation). Foram testadas, sempre com uma vazão de 1 ml/min, em várias proporções e gradientes, as seguintes combinações como fase móvel: acetonitrila:água:acetato de etila, metanol:água:acetato de etila e metanol (MeOH):acetonitrila (ACCN):diclorometano (DCM).

A combinação que apresentou melhores resultados foi a última, com o gradiente, MeOH:ACCN:DCM variando de 20:80:0 para 20:50:30 em 40 minutos.

Como não houve boa separação entre as xantofilas na coluna de C₁₈, e já havia sido demonstrado anteriormente para manga que a coluna de ciano apresentava melhor separação das xantofilas, foi utilizada a mesma coluna de ciano, especificada no item anterior (4.3.3.1), com a seguinte fase móvel: gradiente de 0 a 40% de acetona em n-hexano em 30 min.

4.3.2.3. Folhas verdes

Para a separação dos carotenóides minoritários provitamínicos A de folhas verdes utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ de 5 µm, marca Vydac 201-TP54 (250 mm x 4,6 mm) (Vydac Separation Group).

A fase móvel utilizada foi metanol:água (98:2), de modo isocrático, com vazão de 1,5 ml/min, e pressão de 80 atm no sistema (CRAFT *et alii*, 1990; GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA, 1994).

4.4. Análise Qualitativa

4.4.1. Espectrofotometria UV/visível

Os espectros de carotenóides obtidos nos espectrofotômetros, Philips-modelo PU 8700 ou Perkin-Elmer modelo Lambda 6, foram comparados com os da literatura (DAVIES, 1976; BRITTON, 1985) fornecendo uma primeira indicação da identidade dos carotenóides. A forma do espectro e os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) refletem algumas características estruturais.

4.4.2. Co-cromatografia

Foram utilizados padrões de β -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina (Hoffmann-La Roche) e de *cis*-neoxantina e *trans*-violaxantina isoladas de couve para a co-cromatografia com o extrato total de manga. α -Caroteno isolado de cenoura foi empregado para a co-cromatografia com α -caroteno de folhas.

4.4.3. Reações químicas

Reações químicas específicas foram utilizadas para confirmar a presença e posição de alguns grupos funcionais e verificar a configuração isomérica (*cis* ou *trans*) dos carotenóides.

O carotenóide aldeídico foi reduzido à álcool primário com LiAlH_4 . Ao pigmento dissolvido em EE adicionou-se cerca de 100 mg de LiAlH_4 finamente moído. A reação foi interrompida lavando-se a solução com água (EUGSTER, 1994). O carotenóide reduzido foi purificado em placa de sílica, onde apresentava uma maior adsorção que o pigmento original. O seu espectro na região do visível apresentou λ_{max} e forma compatíveis com o carotenóide hidroxilado.

Para verificar a configuração isomérica (geométrica), algumas gotas de solução de iodo foram adicionadas ao pigmento dissolvido em EP seguido de exposição à luz por 1 minuto. Registrou-se o espectro UV/visível antes e após a reação (DAVIES, 1976). O carotenóide *trans* acusa um deslocamento hipsocrômico e o *cis* batocrômico.

A presença de 1 ou 2 grupos epóxidos na posição 5,6- ou 5,6- e 5',6'-, foi indicada pela diminuição de 20 a 40 nm nos λ_{max} , respectivamente, após adição de algumas gotas de HCl 0,1N à solução etanólica do pigmento, devida ao rearranjo epóxido-furanóxido (de 5,6- em 5,8-epóxido) (DAVIES, 1976).

Após cada reação, os carotenóides foram transferidos para EE e a solução etérea lavada várias vezes com água. Adicionou-se Na_2SO_4 anidro para retirada da água remanescente. Para os carotenóides isolados, as reações foram acompanhadas espectrofotometricamente e para o extrato total de manga, as reações foram monitoradas por CLAE. Neste caso, após secagem sob N_2 , o extrato foi redissolvido em hexano e injetado no cromatógrafo líquido.

4.4.4. Espectrometria de massas

4.4.4.1. Avaliação visual

Foi realizada uma inspeção visual em todas as ampolas contendo os carotenóides previamente purificados. Os pigmentos que apresentaram material branco solúvel em éter etílico (principalmente com a segunda fração retirada da coluna de alumina) ou aspecto oleoso, foram novamente recromatografados em placa de

MgO:kieselguhr. A primeira fase móvel utilizada foi 4% de acetona em EP onde os lipídeos e o material branco (provavelmente ceras ou esteróis) corriam com a frente do solvente. A segunda fase móvel foi a mesma usada na separação prévia desses mesmos carotenóides (Tabela 3).

Com quantidades maiores de carotenóides, uma coluna de MgO:Hiflosupercel (1:1) ativada a 120°C/2h foi utilizada em lugar da placa. Neste caso foram empregados EP e 4% de AC em EP (volume total mínimo de 200 ml) como fases móveis. Depois da coluna secar, a banda do pigmento foi cortada e o carotenóide extraído, em funil de vidro sinterizado, com éter etílico e gotas de acetona.

A recromatografia foi repetida até que o pigmento estivesse livre dos lipídeos ou do material branco.

Quando o pigmento apresentou grande quantidade de material branco, a seguinte técnica foi utilizada antes da recromatografia: ao pigmento seco e congelado adicionou-se pequeno volume de éter etílico supergelado e a solução foi imediatamente passada em mini-coluna com 1 a 2 cm de lã de vidro até eluição completa do pigmento. O material branco apresentava menor solubilidade que o carotenóide em EE gelado, ficando retido na lã de vidro. Esta operação não podia demorar mais que 1 minuto, para não ocorrer solubilização do material branco.

A avaliação visual dos carotenóides previamente purificados é de extrema importância. WRIGHT & SHEARER (1984) relataram que os lipídeos incolores provenientes da amostra e resíduos de C₁₈ da coluna analítica mascararam os picos referentes aos fragmentos dos carotenóides, só permitindo que os pesos moleculares fossem obtidos dos espectros de massas dos carotenóides de fitoplâncton marinho.

4.4.4.2. Purificação final

Imediatamente antes da espectrometria de massas, todos os carotenóides foram purificados em mini-coluna de alumina (grau III para carotenos e entre III e IV para os demais carotenóides). Para a eluição utilizou-se diferentes porcentagens de EE em EP. Nos casos em que o pigmento não eluía da coluna adicionou-se quantidades crescentes de acetona em EE. O uso de acetona deve ser minimizado porque, além do carotenóide, impurezas da sílica proveniente da camada delgada podem ser eluídas. Além disso, polímeros presentes na acetona também podem fornecer picos adicionais ao espectro de massas.

4.4.4.3. Instrumentação

Utilizou-se dois espectrômetros de massas marca VG (VG Biotech., UK) modelos Micromass-7070F e Quattro Triple Quadrupole (faixa de massa: 40 a 700 por seg), dependendo da disponibilidade.

Os carotenóides foram diretamente introduzidos por sonda na câmara de ionização a 240°C. Utilizou-se ionização por impacto de elétrons, com energia de 70eV.

A interpretação dos espectros de massas foi baseada nas fragmentações características, disponíveis na literatura (ENZELL *et alii* 1969; VETTER *et alii*, 1971; ENZELL & BROMAN, 1994).

4.5. Análise Quantitativa dos carotenóides da Manga e do Suco de Manga

4.5.1. Preparo dos padrões

4.5.1.1. Preparo da solução de padrão interno

Sudan I, 1-(fenilazo)-2-naftalenol, (Sigma) foi utilizado como padrão interno devido à sua estabilidade, não necessitando portanto de purificações frequentes. No Anexo 1 encontram-se sua fórmula química e espectro de absorção na região do visível.

Preparou-se uma solução em metanol com 105,5 µg/ml de concentração, que foi dividida em vários tubos de 8 ml com tampa, os quais foram estocados em congelador, a -15°C.

À cada solução de carotenóide padrão e de amostra, adicionou-se, com pipetador automático (Nichiryo Co.), 100 µl da solução de padrão interno, correspondente à 10,55 µg de Sudan I, para posterior quantificação.

4.5.1.2. Preparo dos padrões de carotenóides

Os padrões de β -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina foram cedidos pela Hoffmann-La Roche (Basel, Suíça). Como as ampolas de padrões não foram utilizadas logo após terem sido abertas, estes foram purificados em coluna clássica de MgO:Hiflosupercel (1:1), ativados a 120 °C por 2h, ou em coluna clássica de alumina neutra imediatamente antes da obtenção das curvas padrão.

Os padrões de *trans*-, *cis*-violaxantina e luteoxantina foram obtidos como descrito nos itens 4.2 e 4.3.3.1. Deste mesmo modo, mas a partir do extrato saponificado do suco de manga, foi purificada a auroxantina.

A neoxantina foi isolada de couve, como descrito detalhadamente por MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA (1990) e repurificada em coluna de alumina imediatamente antes do uso.

4.5.2. Quantificação

A concentração de cada pigmento padrão foi obtida a partir da absorvância máxima, aplicando-se a Lei de Beer, e utilizando-se as absortividades ($A_{1cm}^{1\%}$) apresentadas por DAVIES (1976). No caso da luteoxantina utilizou-se a média das absortividades da flavoxantina e taraxantina. Como não foi encontrado na literatura a $A_{1cm}^{1\%}$ da 9-*cis*-violaxantina, utilizou-se, neste caso, o coeficiente da *trans*-violaxantina. A Tabela 4 mostra os solventes em que os pigmentos foram dissolvidos e os coeficientes utilizados no cálculo da concentração de cada carotenóide.

As curvas de calibração foram construídas com no mínimo quatro concentrações diferentes, em triplicata, para cada carotenóide. Com o auxílio do software Energrafic, obteve-se o perfil das curvas, as equações das retas e seus coeficientes de correlação que estão apresentados nas Figuras 10 a 13 e na Tabela 5. Todas as correlações apresentaram alta significância (Tabela 5), indicando uma relação real entre as áreas e concentrações (O'MAHONEY, 1986).

A quantificação foi feita, conforme descrito anteriormente, utilizando-se Sudan I como padrão interno. Foram construídas curvas-padrões para cada carotenóide, com exceção da *cis*- β -criptoxantina, 13-*cis*-violaxantina e neoxantina para as quais utilizou-se as curvas da *trans*- β -criptoxantina, 9-*cis*-violaxantina e *cis*-neoxantina, respectivamente.

TABELA 4: Solventes e absortividades utilizados para o cálculo da concentração de diversos carotenóides padrões.

PIGMENTO	SOLVENTE	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ^a
β-caroteno	éter de petróleo	2592
β-criptoxantina	éter de petróleo	2386
zeaxantina	éter de petróleo	2350
violaxantina	etanol	2550
neoxantina	etanol	2243
auroxantina	etanol	1850
luteoxantina	benzeno	2462 ^b

^a De acordo com Davies (1976).

^b Média das absortividades da flavoxantina e taraxantina.

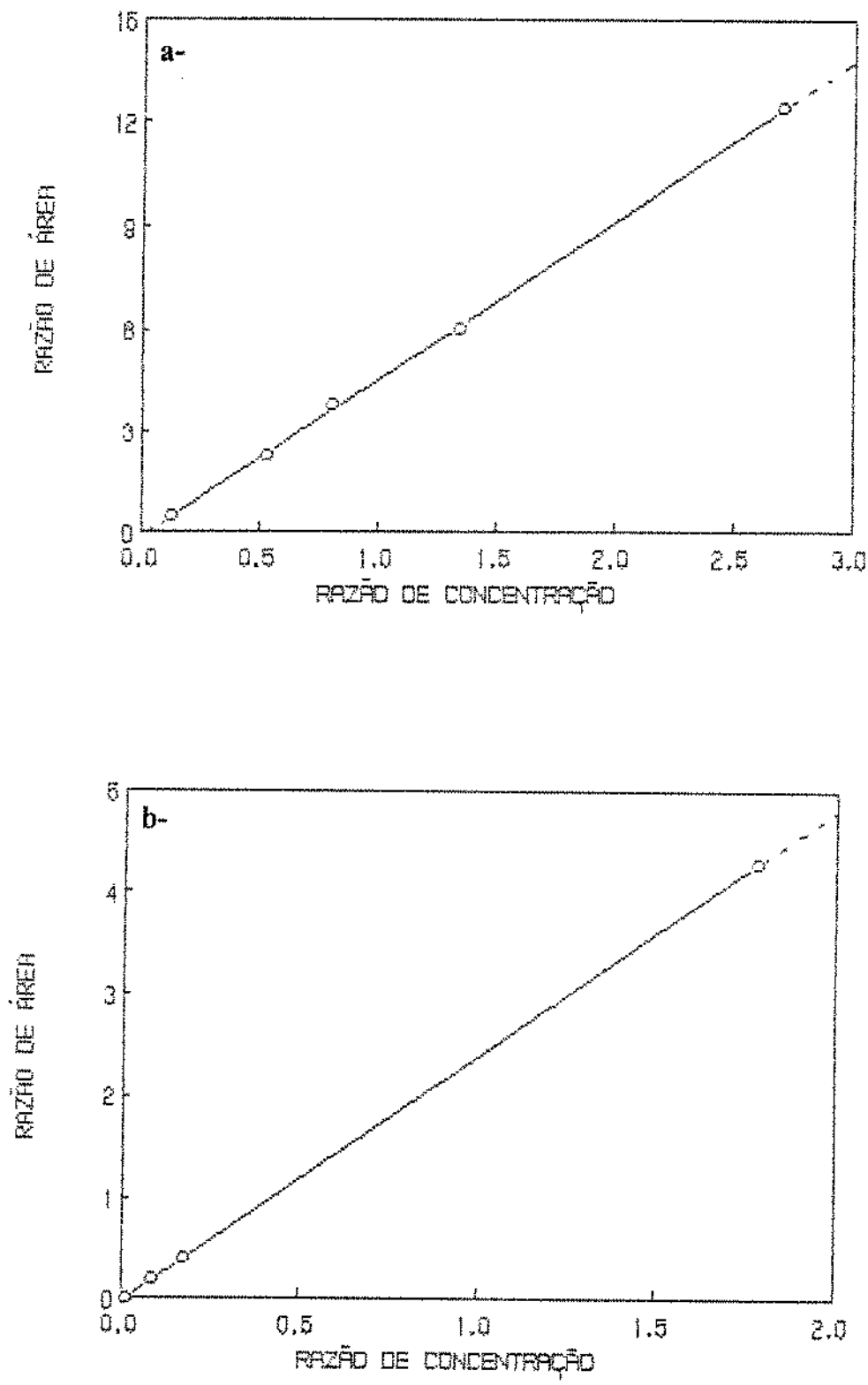


FIGURA 10: Curvas padrão de a- β -caroteno e b- β -criptoxantina.

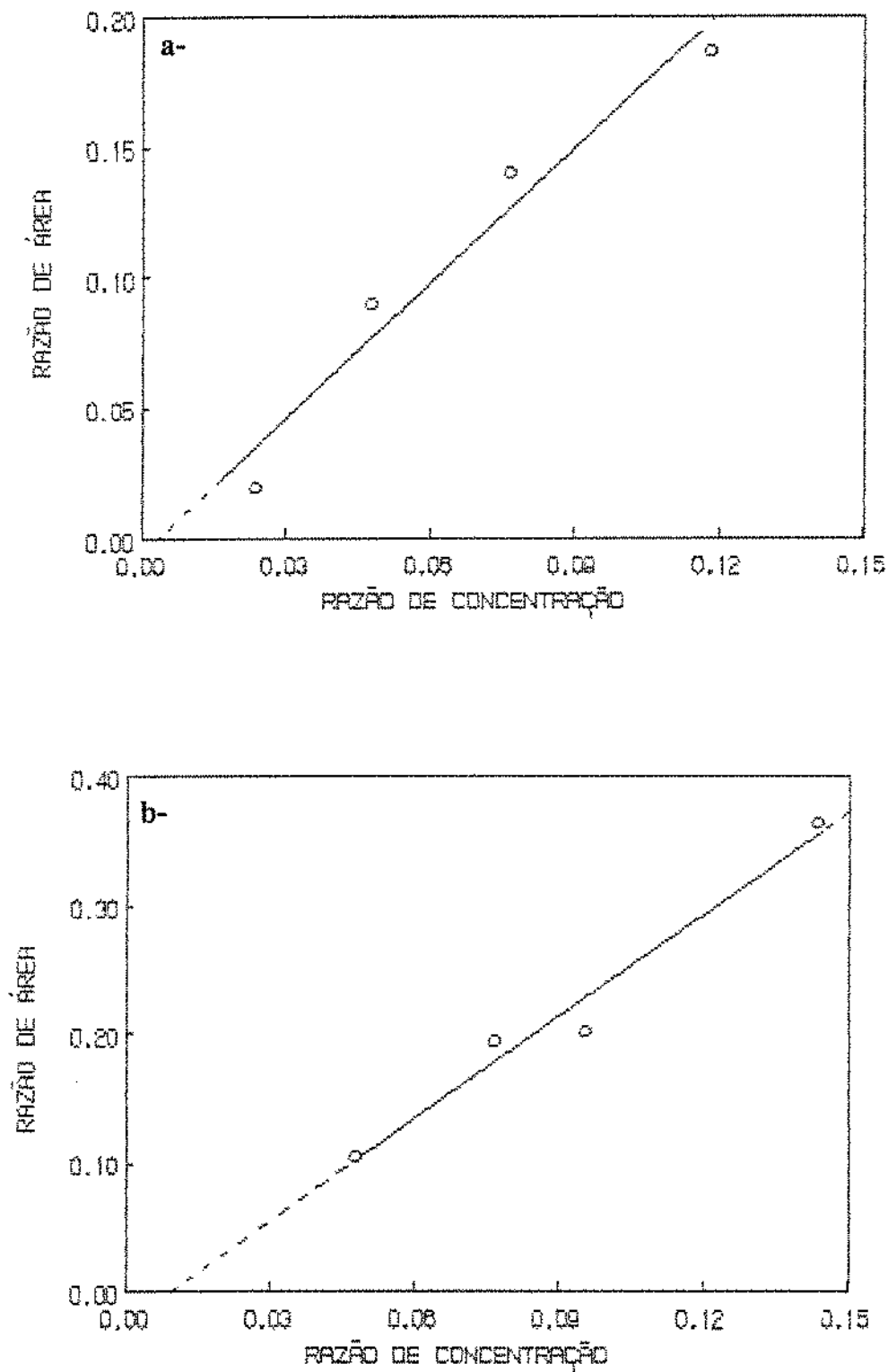


FIGURA 11: Curvas padrão de a- zeaxantina e b- luteoxantina.

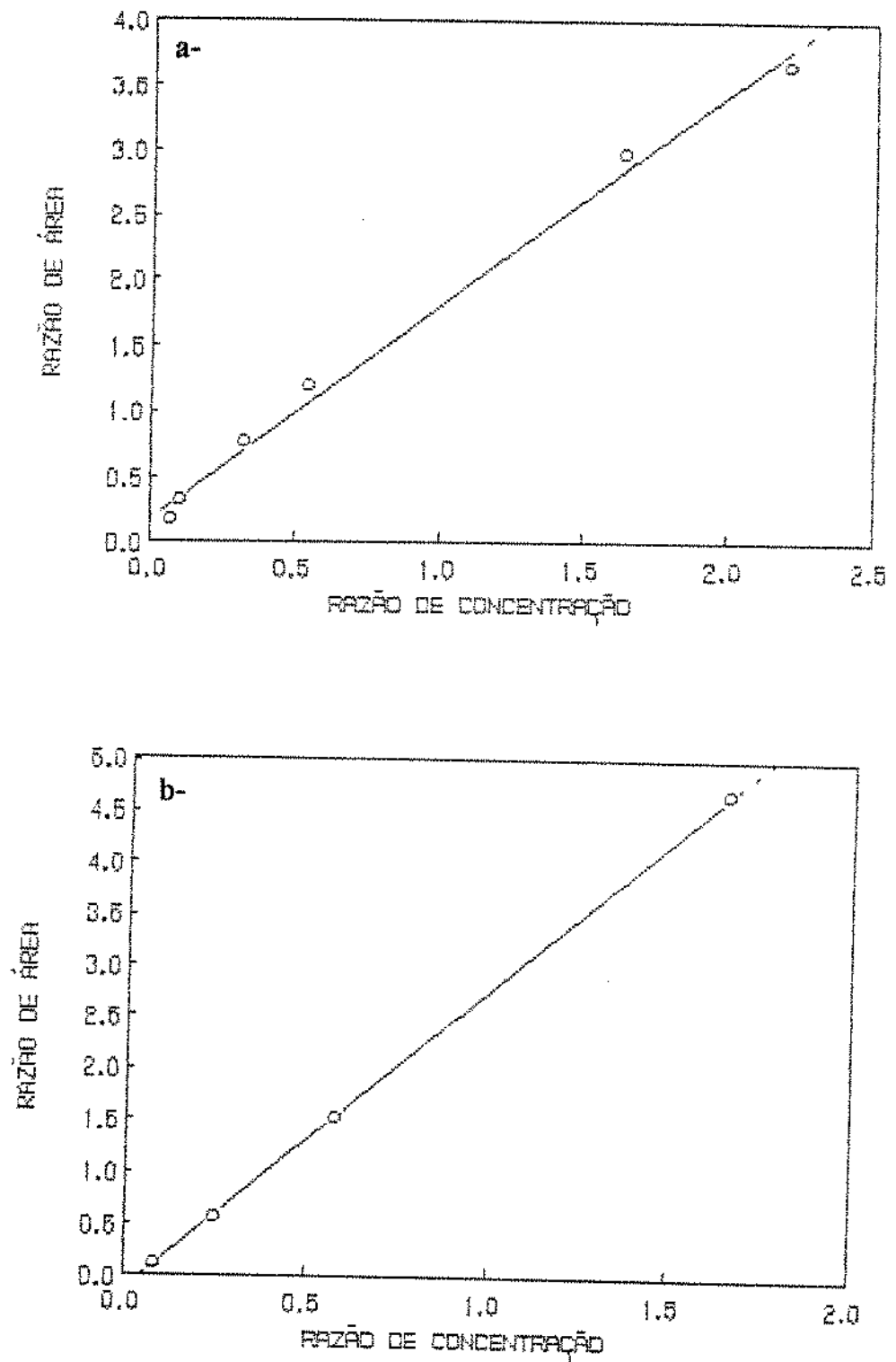


FIGURA 12: Curvas padrão de a- violaxantina e b- 9-*cis*-violaxantina.

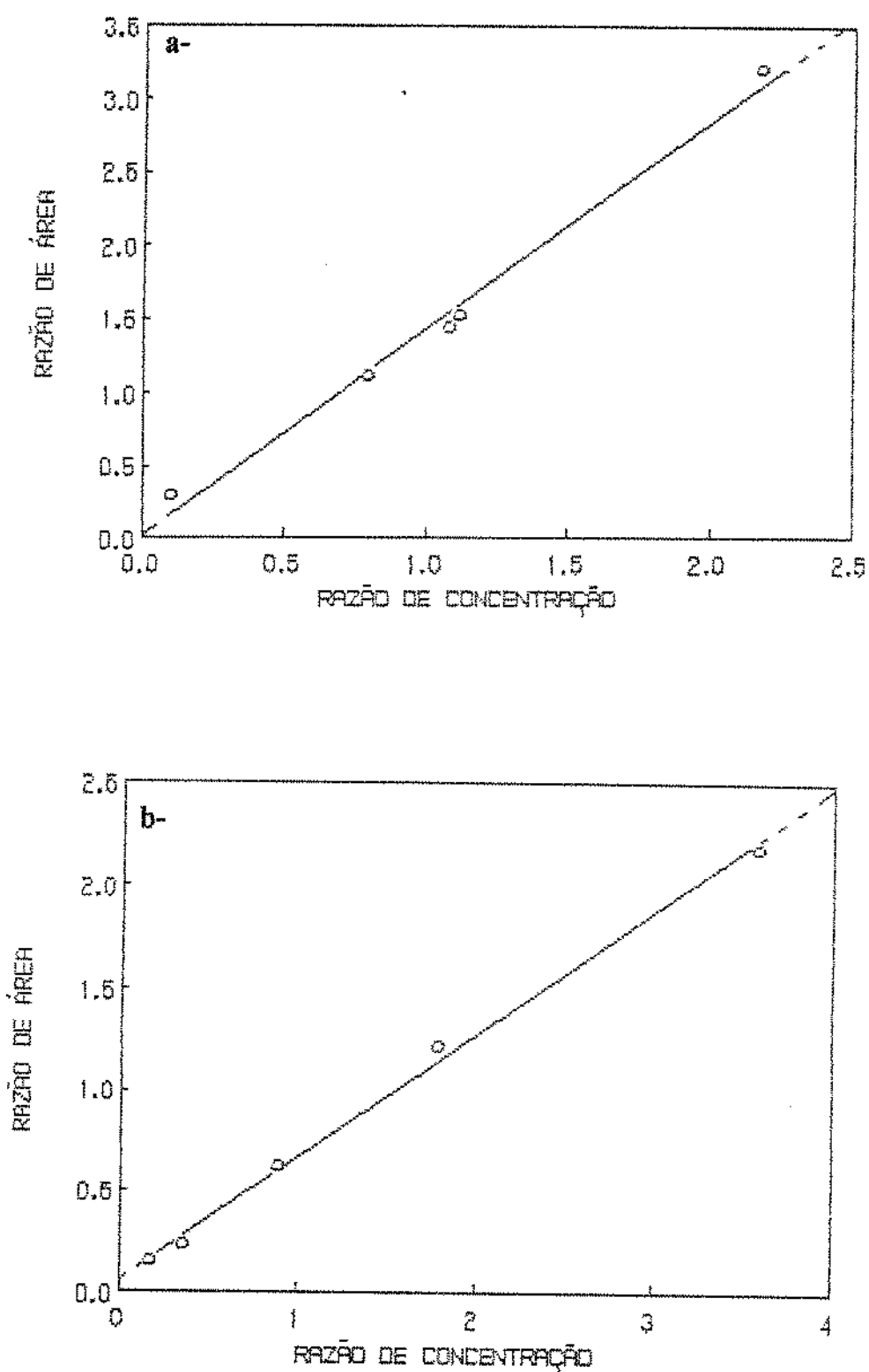


FIGURA 13: Curvas padrão de a- *cis*-neoxantina e b- auroxantina.

TABELA 5: Equação da reta e coeficiente de correlação das curvas de calibração.

Carotenóide	Equação	Coeficiente de correlação	Nível de significância
β -caroteno	$y = 4,5850x - 0,0094$	0,9995	0,0005
β -criptoxantina	$y = 2,4062x - 0,0113$	1,0000	0,0005
zeaxantina	$y = 1,7252x - 0,0051$	0,9762	0,0250
luteoxantina	$y = 2,6498x - 0,0236$	0,9843	0,0100
violaxantina	$y = 1,6326x + 0,1945$	0,9969	0,0005
9- <i>cis</i> -violaxantina	$y = 2,8066x - 0,1137$	1,0000	0,0005
neoxantina	$y = 1,4162x + 0,0274$	0,9949	0,0005
auroxantina	$y = 0,6051x + 0,0669$	0,9985	0,0005

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Carotenóides da Manga

5.1.1. Composição Qualitativa

Os carotenóides β -criptoxantina, violaxantina e neoxantina, isolados por CLAE, e o β -caroteno, separado em coluna clássica, tiveram suas identidades confirmadas por EM. Quando utilizou-se grande quantidade de extrato de manga para a purificação por camada delgada, confirmou-se, também por EM, as estruturas da zeaxantina, luteína, luteoxantina e monoepóxido do β -caroteno.

5.1.1.1. Separação e purificação dos carotenóides

Os carotenóides da manga foram isolados de duas maneiras: separação por cromatografia líquida em coluna clássica seguida por recromatografia em camada delgada, e separação em coluna clássica seguida por isolamento e acumulação dos carotenóides por CLAE.

A Figura 14 mostra a separação dos carotenóides da manga através da coluna clássica de alumina e placas de sílica e MgO:kieselguhr. O extrato total foi separado em três frações na coluna de alumina, sendo que na primeira eluíram os carotenóides menos polares, na segunda os monoidroxilados e na terceira as xantofilas polioidroxiladas.

Da primeira fração visualizou-se cinco bandas na placa de sílica, desenvolvida com 10% de EE em EP, uma intensamente laranja (1.1) que correu com a frente do solvente, duas de coloração pálida (1.2 e 1.3) e as outras duas em baixíssima quantidade. Não foi encontrada nenhuma fluorescência (indicativo de fitoflueno) sob radiação UV a 365 nm. As bandas 1.2 e 1.3 foram purificadas em placa de MgO com 10% de AC em EP como fase móvel, sendo que a primeira apresentou somente um carotenóide e a última dividiu-se em cinco bandas cujos níveis muito baixos impossibilitaram sua recuperação. A fração 1.1 foi isolada previamente para EM por coluna clássica de MgO:Hiflosupercel.

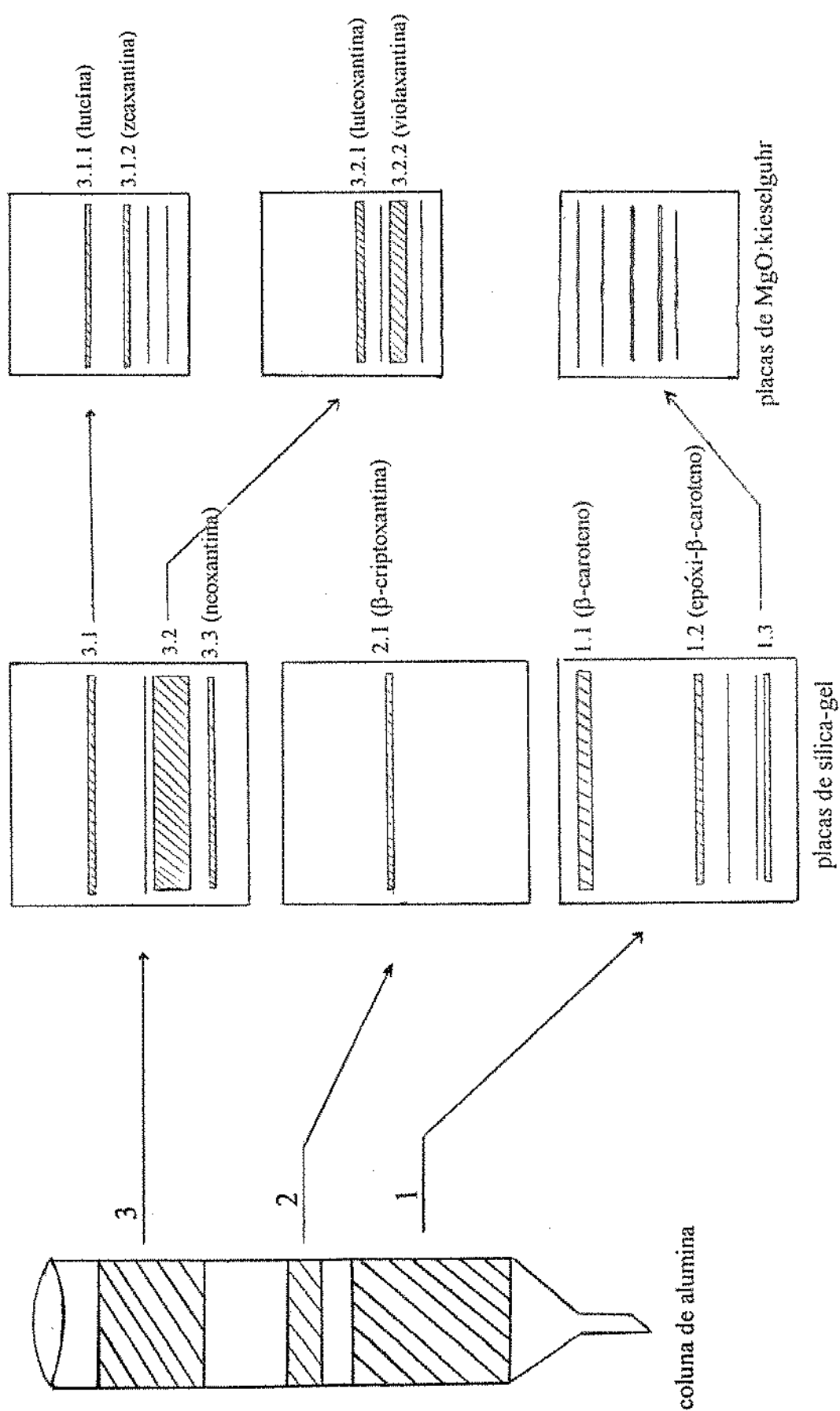


FIGURA 14: Separação e purificação dos carotenóides da manga.

A segunda fração foi submetida à CCD de sílica, com EP-EE (1:1) como fase móvel, onde encontrou-se somente uma mancha (2.1). Este pigmento não foi purificado em camada delgada (CD) de MgO porque já havia sido isolado por CLAE.

Após desenvolvimento em placa de sílica, a terceira fração dividiu-se em quatro bandas, sendo uma de baixa intensidade. O pigmento 3.1 aplicado em CD de MgO, com 25% de EE em EP como fase móvel, subdividiu-se em quatro bandas, sendo as duas primeiras (3.1.1 e 3.1.2), de maior intensidade, eluídas. A banda 3.2 resultou em quatro pigmentos, após purificação em CD de MgO com 30% de EE em EP, sendo que dos dois de maior intensidade, somente o 3.2.1. foi isolado. O carotenóide 3.2.2 e o 3.3 haviam sido purificados por CLAE.

Os cromatogramas das duas cultivares de manga Keitt e Tommy Atkins foram semelhantes e por isso, somente o da manga Keitt no estágio maduro está apresentado na Figura 15. A identidade dos picos do cromatograma e as suas principais características estão apresentadas na Tabela 6.

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção, em éter etílico, íon molecular e principais fragmentos de massas característicos de cada carotenóide encontram-se na Tabela 7. Optou-se, também, por apresentar os espectros de massas a fim de proporcionar uma análise mais geral, ampla e rápida, permitindo, deste modo, evidenciar as diferenças entre os espectros, e a presença ou não de contaminantes.

5.1.1.2. Identificação dos carotenóides

β -Caroteno

O β -caroteno (pico 1) foi, inicialmente, identificado comparando-se seu espectro (λ_{max} e perfil) obtido pelo detector por arranjo de diodos (Figura 16) com os da literatura (VETTER *et alii*, 1971; DAVIES, 1976; BRITTON, 1985), por co-cromatografia com padrão de *trans*- β -caroteno da Hoffmann-La Roche e por reação de isomerização positiva (deslocamento hipsocrômico do λ_{max}) para a forma *trans*. A reação foi monitorada por CLAE, sendo observado um pequeno deslocamento hipsocrômico já que as formas isoméricas não foram separadas na coluna de ciano (Figura 17a). O baixo tempo de retenção (t_R) na coluna de ciano, que é polar, refletiu a ausência de substituintes polares na estrutura do β -caroteno.

O espectro de massas do β -caroteno (Figura 18) apresentou íon molecular de 536 unidades de massa (u.m) e ausência de fragmentos distintos do grupo terminal,

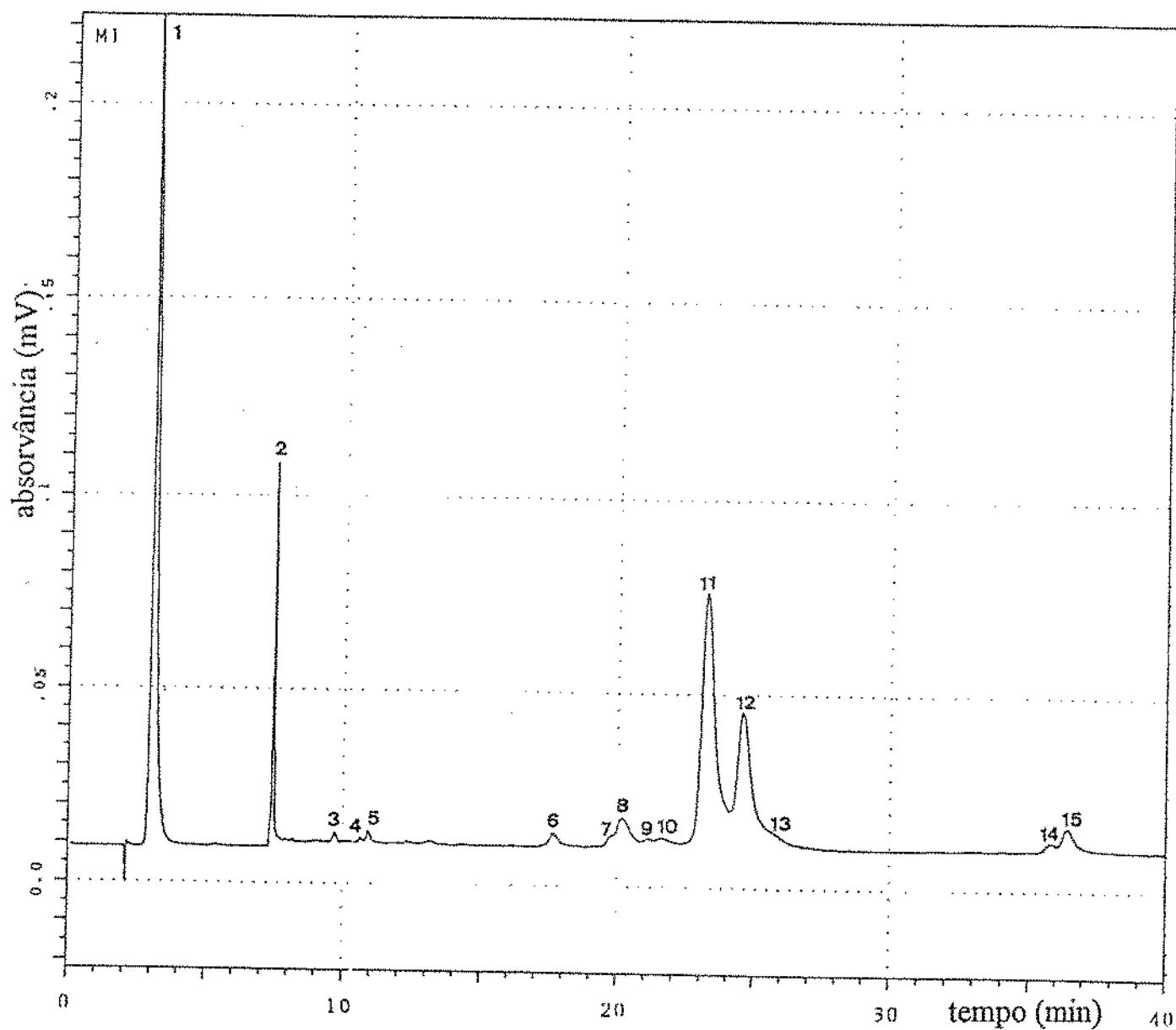


FIGURA 15: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 6. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

TABELA 6: Principais características obtidas por CLAE dos carotenóides da manga.

Pico ^a	Pigmento	Faixa t _R (min)	λ _{max} (nm) ^b	Reação química
01	<i>trans</i> -β-caroteno	2,90 - 3,60	(420) 450 475	<i>trans</i> +
02	sudan I (P.I.)	6,50 - 7,56	_____	_____
03	não identificado	8,89 - 9,75	_____	_____
04	<i>cis</i> -β-criptoxantina	10,11 - 11,11	(420) 444 473	<i>cis</i> +, epóxido -
05	<i>trans</i> -β-criptoxantina	10,44 - 11,88	(423) 450 480	<i>trans</i> +
06	<i>trans</i> -zeaxantina	17,44 - 19,32	(423) 450 478	<i>trans</i> +
07	luteoxantina ^c	20,18 - 22,16	400 424 450	epóxido +
08	<i>cis</i> -luteoxantina ^c	21,14 - 22,68	400 421 449	_____
09	<i>cis</i> -luteoxantina ^c	21,56 - 23,79	394 418 445	_____
10	mistura	22,03 - 24,15	408 429 462	_____
11	<i>trans</i> -violaxantina	22,94 - 26,76	416 440 470	<i>trans</i> +, epóxido +
12	9- <i>cis</i> -violaxantina	24,30 - 28,06	412 437 465	<i>cis</i> +, epóxido +
13	13- <i>cis</i> -violaxantina	25,98 - 28,94	410 434 461	<i>cis</i> +
14	<i>cis</i> -neoxantina	35,31 - 39,59	412 436 465	<i>cis</i> +, epóxido +
15	<i>trans</i> -neoxantina	35,97 - 40,17	418 441 471	<i>trans</i> +, epóxido +

^aNumeração de acordo com o cromatograma da Figura 15.

^bObtidos pelo detector de arranjo de diodos. Valores entre parênteses indicam ombro no lugar de pico. Fase móvel: gradiente de acetona em n-hexano.

^cIdentificação especulativa mais provável. Devido às quantidades muito pequenas, não foi possível executar as reações químicas.

PI: padrão interno.

TABELA 7 : Fórmula molecular, λ_{max} razão m/e e abundância relativa (%) dos fragmentos de massas característicos e íon molecular dos carotenóides da manga.

Carotenóide	Fórmula molecular	λ_{max} (nm) ^a	m/e (% abundância relativa)		Íon molecular
Fragmentos					
β -caroteno	$C_{40}H_{56}$	(425) 450 476	105 (100,0)	399 (0,8) 430 (0,3) 444 (3,9)	536 (7,4)
epóxi- β -caroteno	$C_{40}H_{56}O$	405 430 455	69 (100,0)	105 (93,7) 205 (69,7) 472 (20,6)	552 (17,9)
β -criptoxantina	$C_{40}H_{56}O$	(425) 450 475	69 (98,6)	442 (0,4) 460 (0,4) 534 (0,4)	552 (0,6)
zeaxantina	$C_{40}H_{56}O_2$	(426) 450 476	55 (100,0)	446 (0,5) 532 (0,2) 550 (0,2)	568 (0,3)
luteína	$C_{40}H_{56}O_2$	420 445 473	105 (100,0)	458 (0,2) 476 (0,1) 532 (0,3) 550 (1,4)	568 (0,3)
luteoxantina	$C_{40}H_{56}O_4$	397 420 446	119 (100,0)	181 (90,4) 221 (98,2) 440 (1,4) 520 (0,8)	600 (6,3)
violaxantina	$C_{40}H_{56}O_4$	416 440 464	181 (13,6)	221 (22,8) 352 (2,6) 440 (1,4) 520 (0,8)	600 (0,6)
neoxantina	$C_{40}H_{56}O_4$	416 438 466	91 (100,0)	221 (66,4) 502 (11,1) 582 (8,7)	600 (9,2)

^aEm éter etílico.

Valores entre parênteses indicam ombro no lugar de pico.

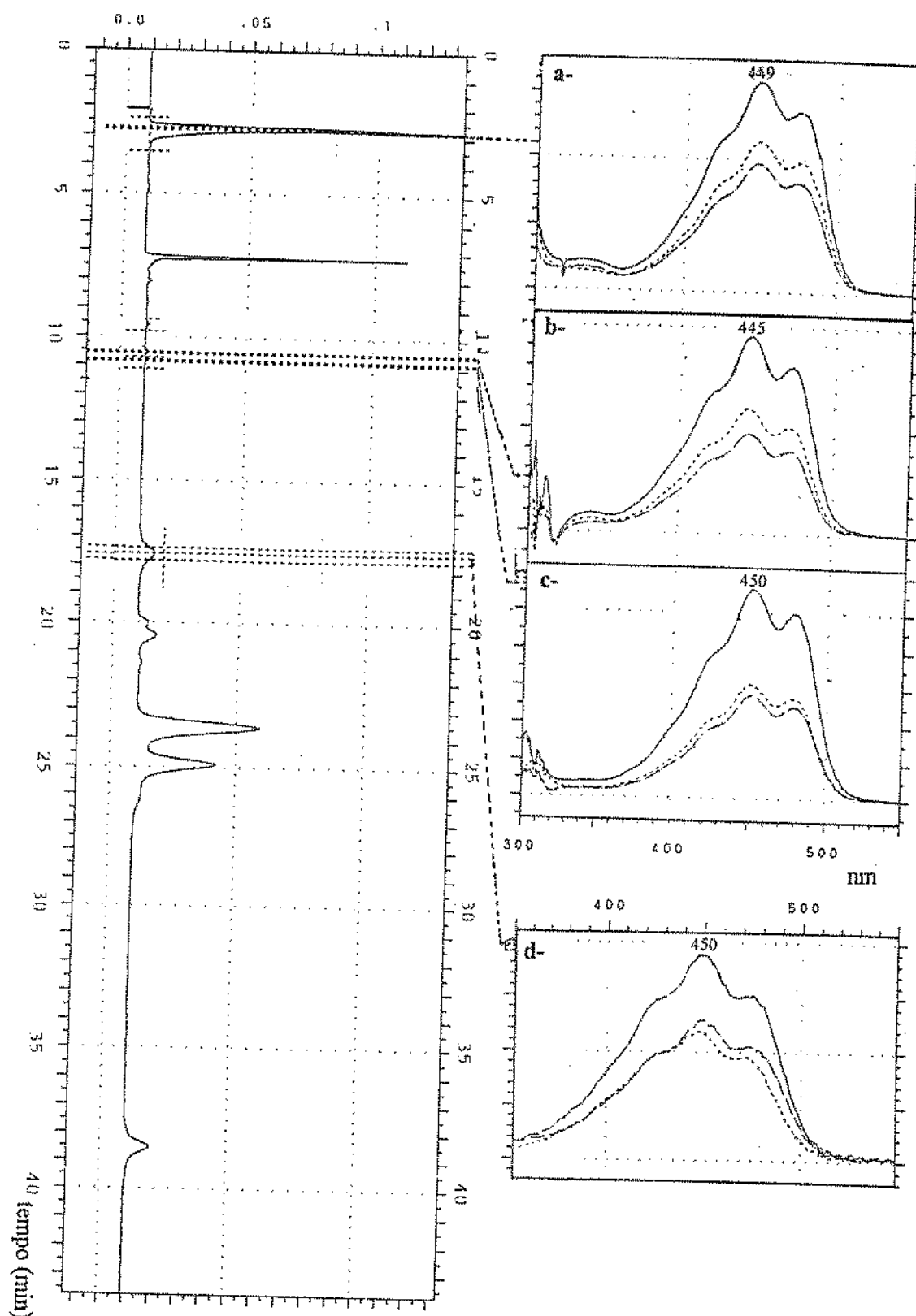


FIGURA 16: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- β -caroteno, b- *cis*- β -criptoxantina, c- β -criptoxantina e d- zeaxantina. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

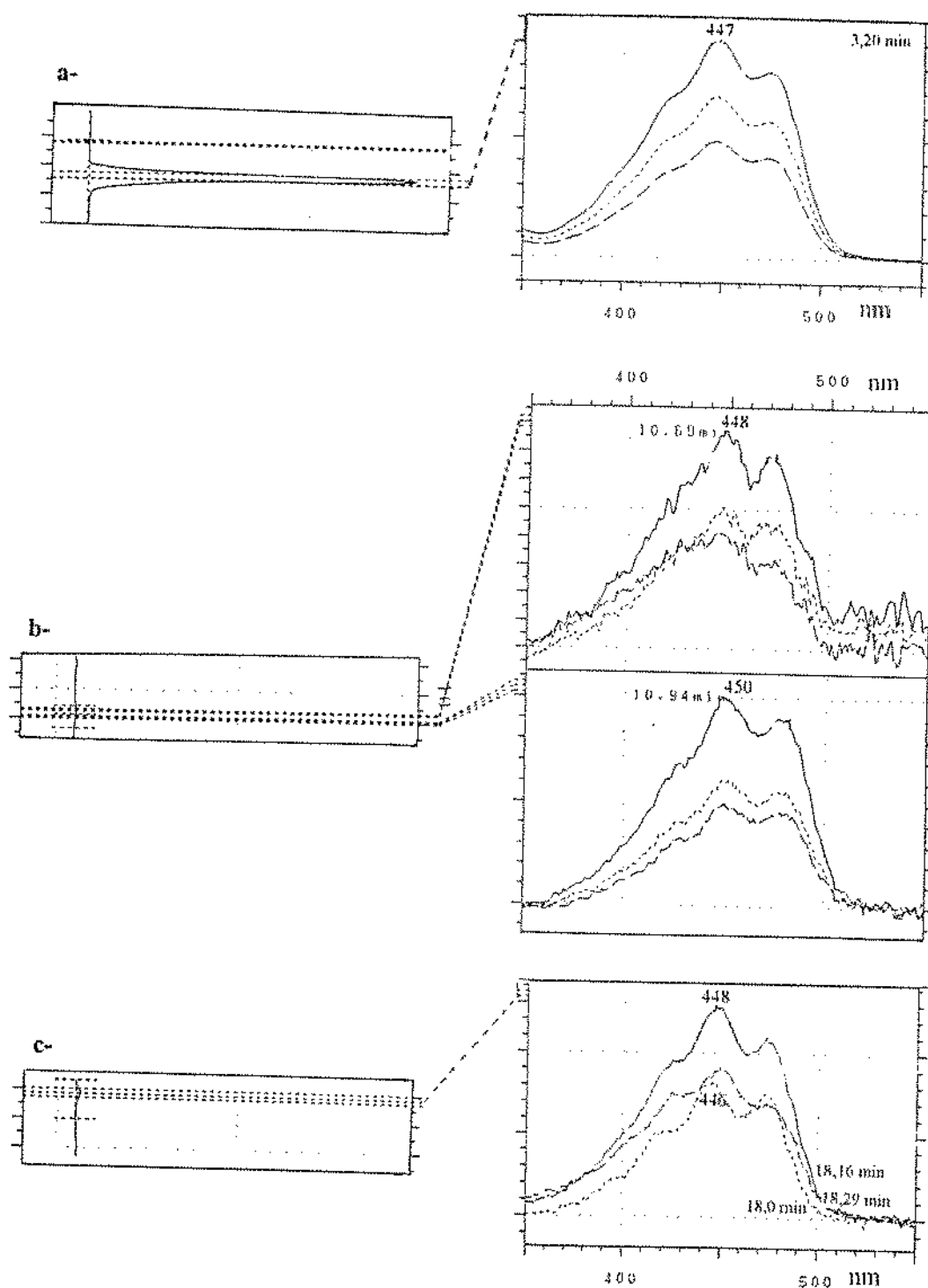


FIGURA 17: Cromatogramas parciais e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, após reação de isomerização de a- β -caroteno, b- *cis*- e *trans*- β -criptoxantina e c- zeaxantina.

uma vez que a perda do anel β -ionona (M-137) resulta, frequentemente, em um pico de baixíssima intensidade. Nosso espectro apresentou os mesmos picos característicos do reportado na literatura (VETTER *et alii*, 1971). A razão $[M-92]^+/[M-106]^+$ obtida aqui foi de 13,0, similar à razão 12,9 encontrada por SCHWIETER *et alii* (citado por ENZELL, 1969). Este valor é indicativo de um carotenóide cíclico com os dois grupos terminais idênticos (BRITTON & YOUNG, 1993).

Monoepóxi- β -caroteno

O espectro de massas do monoepóxi- β -caroteno (Figura 19) mostrou o esperado íon molecular de 552 u.m.. O pico a m/e 472 (M-80) (pico de maior intensidade que o do íon molecular), característico da eliminação de um grupo epóxido, e os picos a m/e 336, 205 e 165 indicaram que o epóxido está em um anel β -ionona não hidroxilado.

O espectro de absorção demonstrou $\lambda_{\max}$ 20 nm mais baixo que do β -caroteno, compatível com um epóxido na posição 5,8. Como a purificação foi feita em placa de sílica, onde pode ocorrer rearranjo de 5,6- para 5,8-epóxi- β -caroteno, o tipo de grupo epóxido não pode ser assegurado, já que a EM não os diferencia.

Picos 2 e 3

Sudan I (pico 2) que foi utilizado como padrão interno, eluiu logo após o β -caroteno.

Os espectros no UV-visível do detector por arranjo de diodos do pico 3 apresentaram-se diferentes de uma corrida para outra, indicando ser, provavelmente, uma mistura de carotenóides (Figura 20).

β -Criptoxantina (*cis* e *trans*)

O pico 4 foi identificado como *cis*- β -criptoxantina devido ao perfil do espectro ser similar ao da *trans*- β -criptoxantina (Figura 16), comprimentos de onda menores que a forma *trans* (diferença de 6 nm no $\lambda_{\max}$), e reação de rearranjo de epóxido negativa, monitorada por CLAE-DCD.

A *trans*- β -criptoxantina (pico 5) foi identificada através do espectro típico similar ao do β -caroteno (Figura 16) e co-cromatografia com padrão de *trans*- β -criptoxantina (Hoffmann-La Roche).

A reação de isomerização foi também realizada com o extrato total e monitorada por CLAE. Devido aos baixos níveis destes carotenóides e às conversões

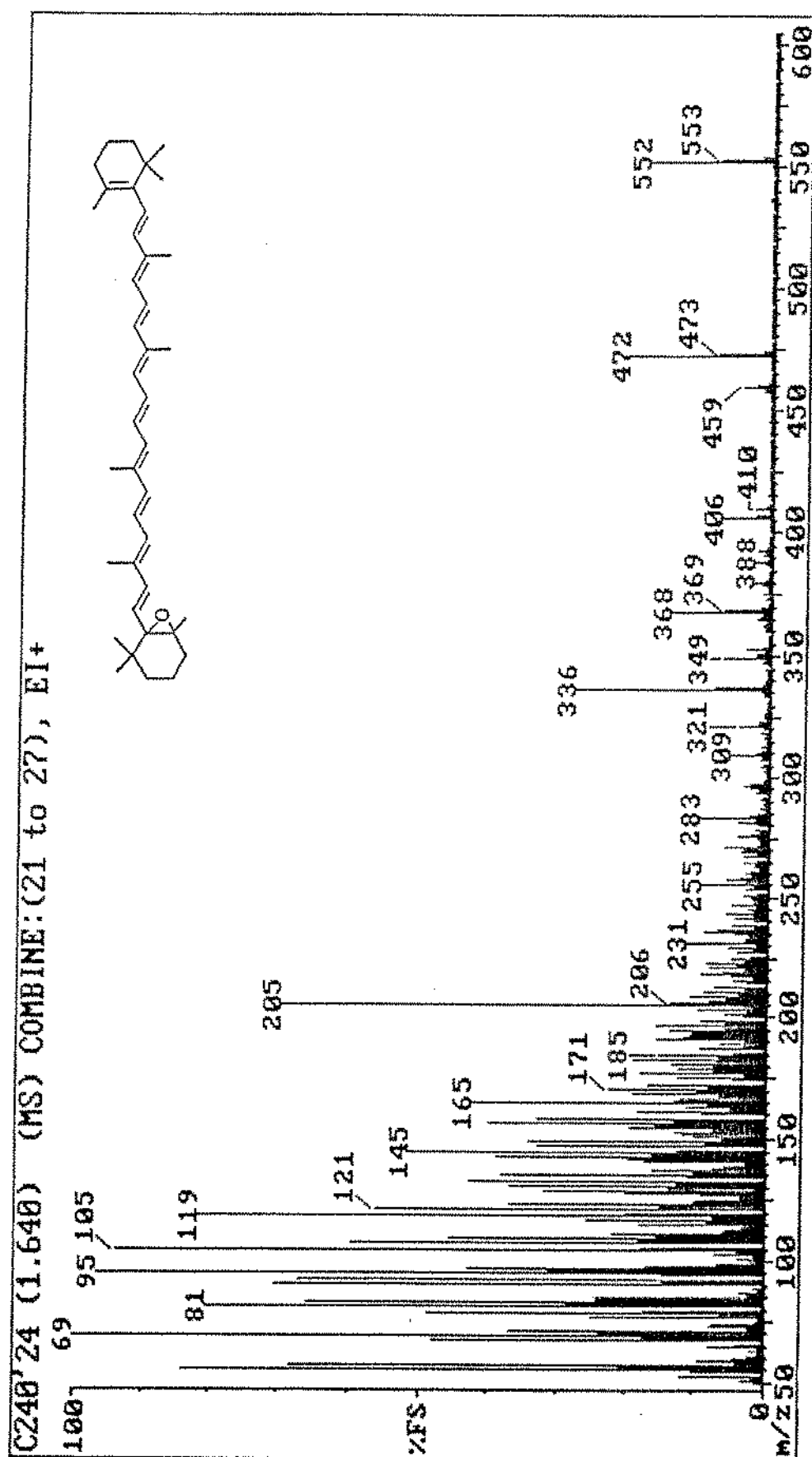


FIGURA 19: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do epóxi-β-caroteno, isolado de manga.

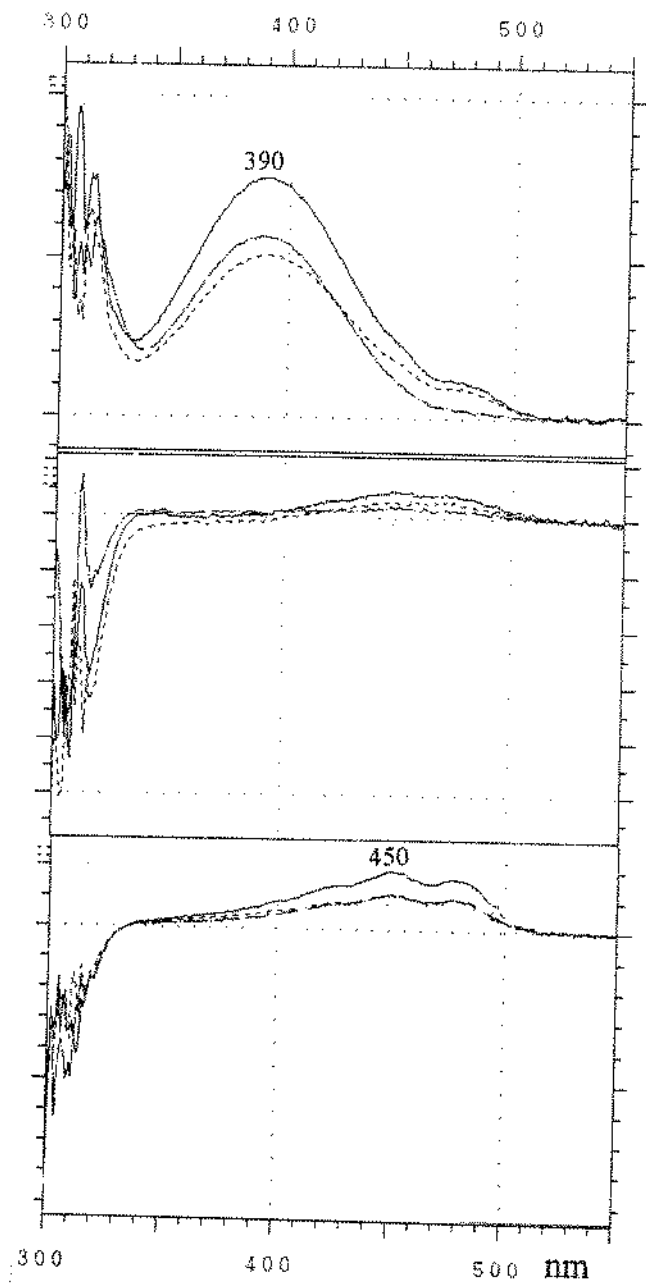


FIGURA 20: Espectros de absorção do pico 3, obtidos pelo DAD.

simultâneas de *cis* para *trans* e vice-versa, o resultado não pode ser conclusivo (Figura 17b).

A β -criptoxantina foi confirmada pelo espectro de massas (Figura 21) que mostrou íon molecular de 552 u.m., fragmento a m/e 534 (M-18) devido à perda de um grupo hidroxílico, e a m/e 460 (M-92), correspondente à eliminação de tolueno da cadeia isoprênica. A razão $[M]^+/[M-18]^+$ obtida foi maior que 1,0, isto é, a intensidade do pico do íon molecular foi maior que a do pico de perda de água, indicando que a hidroxila encontrava-se em posição não alílica. A razão obtida neste trabalho foi 2,4; BRITTON & YOUNG (1993) reportaram um valor de 4,0.

Zeaxantina e luteína

Através do espectro de absorção na região visível (Figura 16) similar ao do *trans*- β -caroteno, da co-cromatografia com padrão de *trans*-zeaxantina da Hoffmann-La Roche e da reação de isomerização positiva para a forma *trans* (Figura 17c), o pico 6 foi identificado como *trans*-zeaxantina. Os espectros fornecidos pelo DAD em três diferentes posições do pico, após isomerização, mostraram que não houve separação das formas geométricas, mas os espectros do ápice e final do pico apresentaram $\lambda_{\max}$ de 448 nm enquanto que o do início do pico, $\lambda_{\max}$ de 446 nm, este último indicativo da forma *cis*. Luteína, que não aparece no cromatograma, foi também encontrada quando grande quantidade de amostra foi utilizada.

Zeaxantina e luteína possuem a mesma fórmula química $C_{40}H_{56}O_2$, e portanto o mesmo valor de 568 u.m. para o íon molecular (Figuras 22 e 23). Além disso, ambos apresentaram fragmentos de massas a m/e 550 (M-18) e a 532 (M-18-18), correspondentes à eliminação de 1 e 2 moléculas de água, respectivamente. A razão $[M]^+/[M-18]^+$ proveniente da zeaxantina (1,25) foi cerca de 6 vezes maior que a da luteína (0,21), confirmando a posição alílica de um grupo hidroxílico na luteína. Os valores, para esta mesma razão, encontrados por VETTER *et alii* (1971) foram 8,3 e 0,74, e por BRITTON & YOUNG (1993) 2,5 e 0,60 para zeaxantina e luteína, respectivamente.

Luteoxantina

Os picos 7, 8, 9 e 10 foram, tentativamente, identificados como *trans*-luteoxantina, *cis*-luteoxantina A, *cis*-luteoxantina B e uma mistura não identificada, respectivamente, com base nos tempos de retenção, indicando uma estrutura com dois grupos hidroxílicos e pelo menos um grupo epóxido, e espectros de absorção na região visível (Figura 24) com comprimentos de onda 20 nm abaixo do valor encontrado para β -caroteno, evidenciando a presença de um grupo epóxido na posição 5,8.

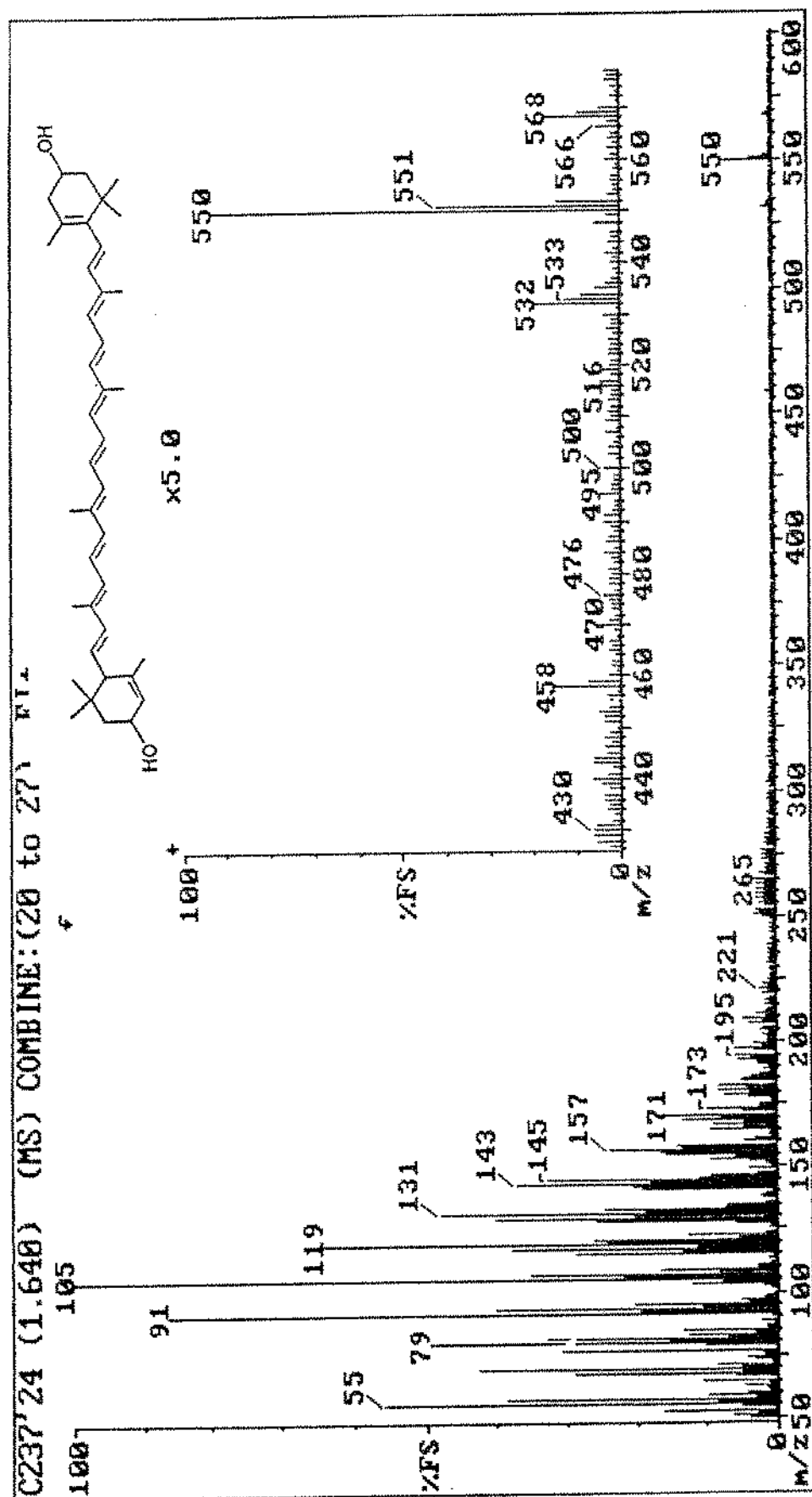


FIGURA 23: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da luteína, isolada de manga.

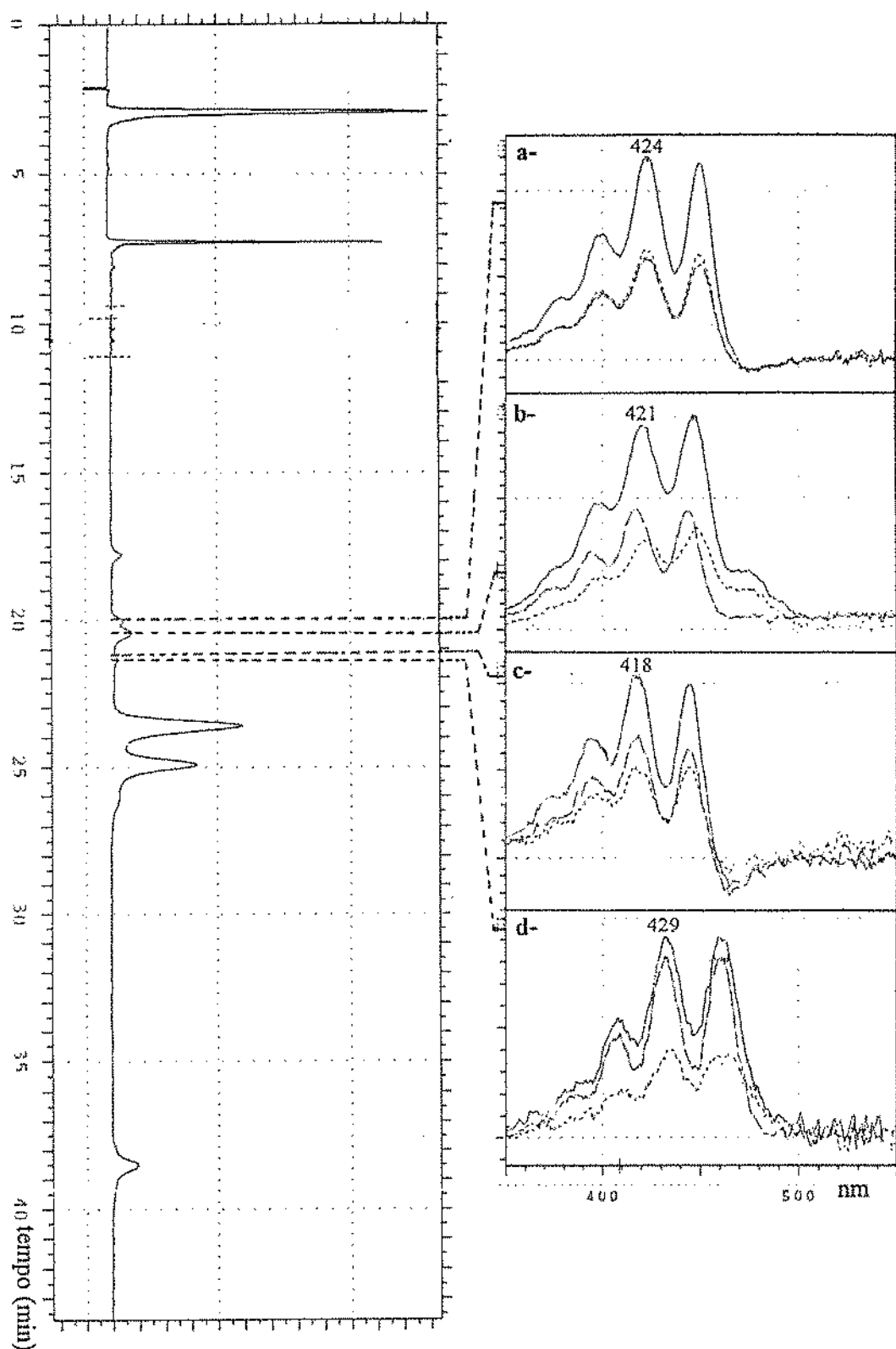


FIGURA 24: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- *trans*-luteoxantina, b- *cis*-luteoxantina A, c- *cis*-luteoxantina B e d- mistura não identificada. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

Após adição de HCl diluído ao pigmento isolado, ocorreu um deslocamento hipsocrômico de 20 nm (Figura 25), monitorado pelo espectrofotômetro, indicando que os carotenóides presentes nesta fração possuem outro grupo epóxido, só que na posição 5,6. Como não havia quantidades suficientes de cada um dos pigmentos, não foi possível realizar reação de isomerização para verificar suas formas geométricas.

A luteoxantina, assim como a violaxantina e a neoxantina, possui íon molecular de 600 u.m., correspondente à fórmula $C_{40}H_{56}O_4$. O espectro de massas da luteoxantina (Figura 26) revelou-se praticamente igual ao da violaxantina (Figura 27), apresentando os fragmentos de massas característicos da presença de dois grupos epóxidos a m/e 440 ($M-80-80$)⁺, em anéis com hidroxilas (pico a m/e 221). O espectro de massas não diferencia entre o 5,6- e 5,8-epóxido, porque a alta temperatura da câmara de ionização promove a transformação do grupo epóxido 5,6 em 5,8 (BRITTON & YOUNG, 1993). Esta diferenciação, entretanto, foi facilmente verificada no espectro obtido na região do visível, onde a presença de um grupo epóxido 5,8 manifestou-se com λ_{max} 20 nm mais baixo em relação ao β -caroteno (Tabelas 6 e 7).

Violaxantina (*trans*, 9-*cis* e 13-*cis*)

Trans-violaxantina (pico 11) foi identificada através da forma e dos comprimentos de onda de absorção máxima do espectro (Figura 28), de reações positivas para a forma *trans* e da presença de dois grupos epóxidos 5,6, monitorados pelo espectrofotômetro (Figura 29).

Com a adição de gotas de HCl, ao extrato total de manga (Figura 30), verificou-se, através da CLAE-DAD, que sumiram os picos correspondentes à fração de violaxantina desapareceram e que parte da violaxantina sofreu rearranjo completo (espectros a, b e c) com deslocamento hipsocrômico de 40 nm e diminuição do tempo de retenção, coincidindo com o t_R da auroxantina. Para a outra parte, a reação foi incompleta, com deslocamento hipsocrômico de 21 a 25 nm, (espectros d e e) e aparecimento dos picos na região de eluição da luteoxantina.

Os isômeros *cis* da violaxantina (picos 12 e 13) apresentaram λ_{max} menores que a forma *trans* e reação positiva para a presença de 2 grupos 5,6 epóxidos, quando monitorados por CLAE (Figura 30) e pelo espectrofotômetro (Figura 31). As reações acompanhadas pelo espectrofotômetro só foram feitas com o pigmento do pico 12 porque não havia quantidade suficiente do outro isômero.

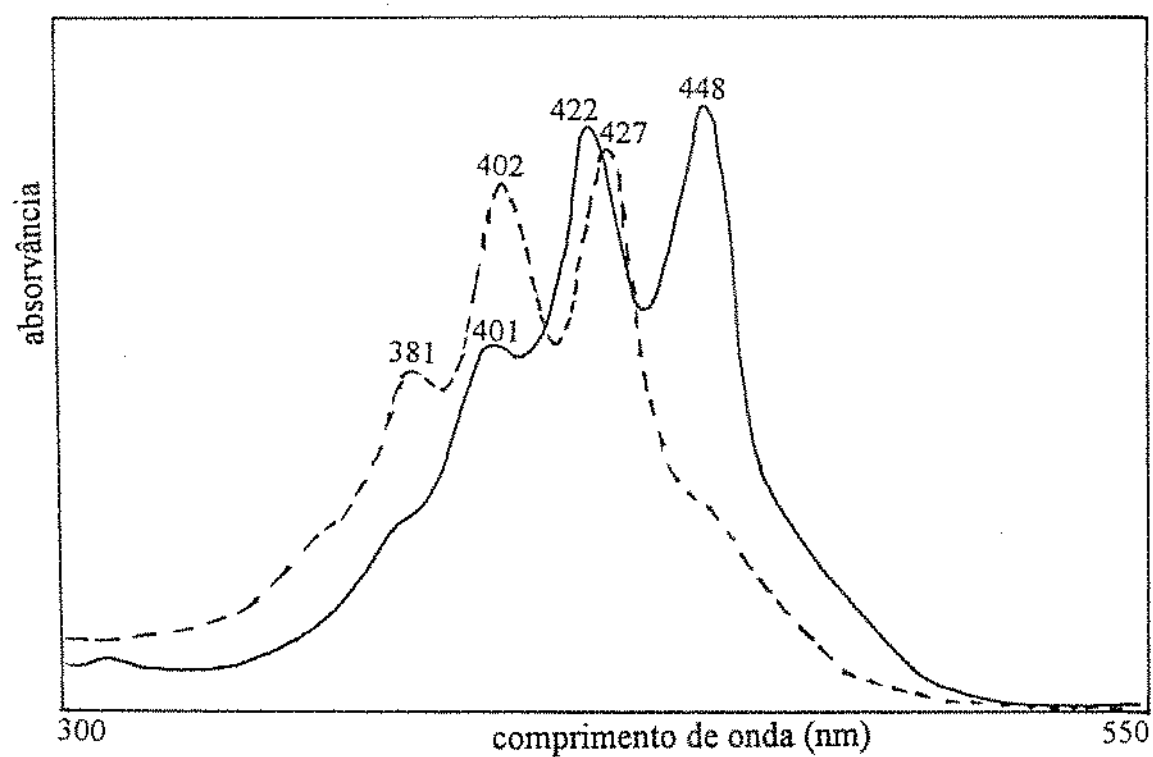


FIGURA 25: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, dos isômeros de luteoxantina em etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (----).

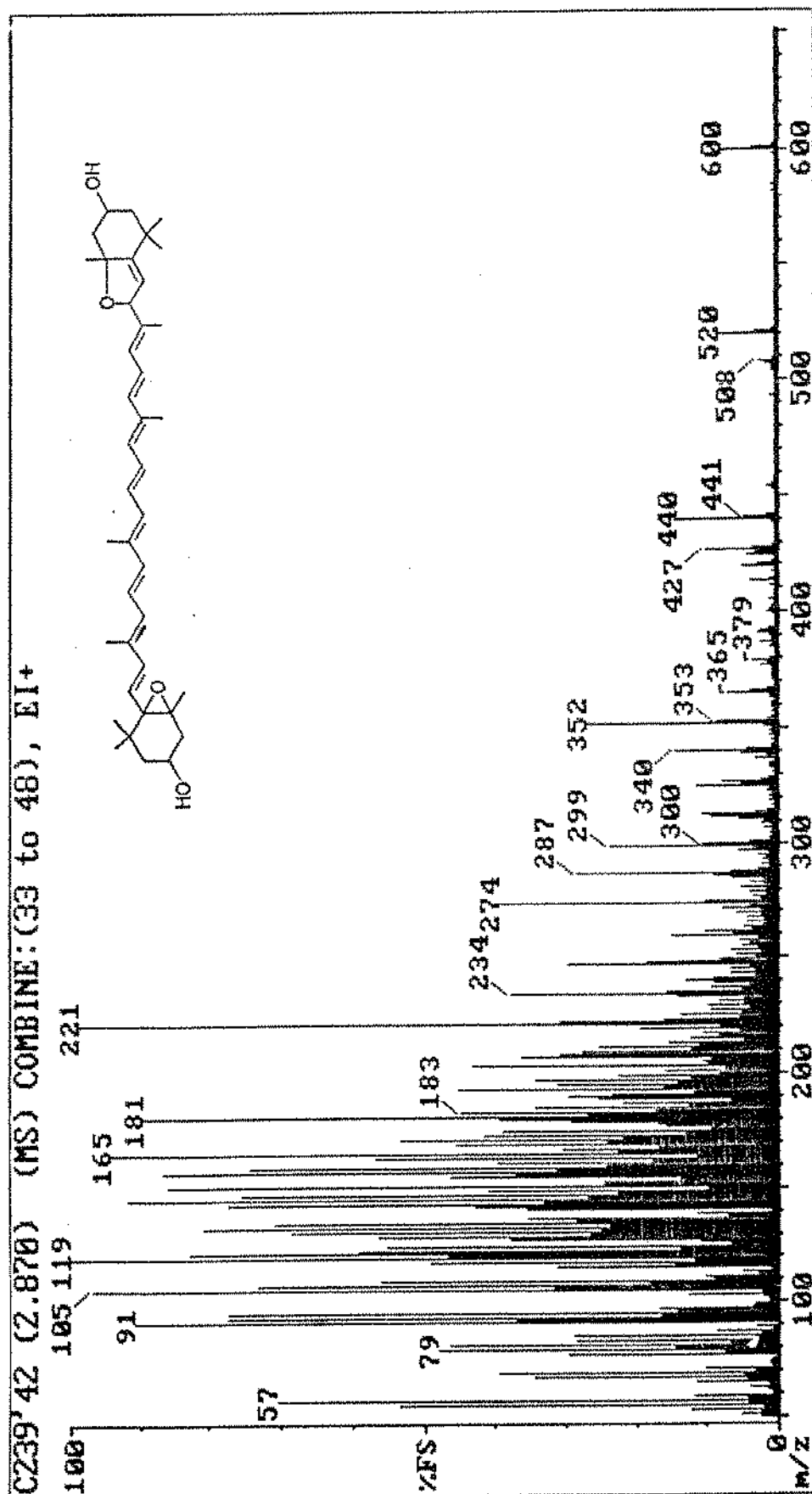


FIGURA 26: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da luteoxantina, isolada de manga.

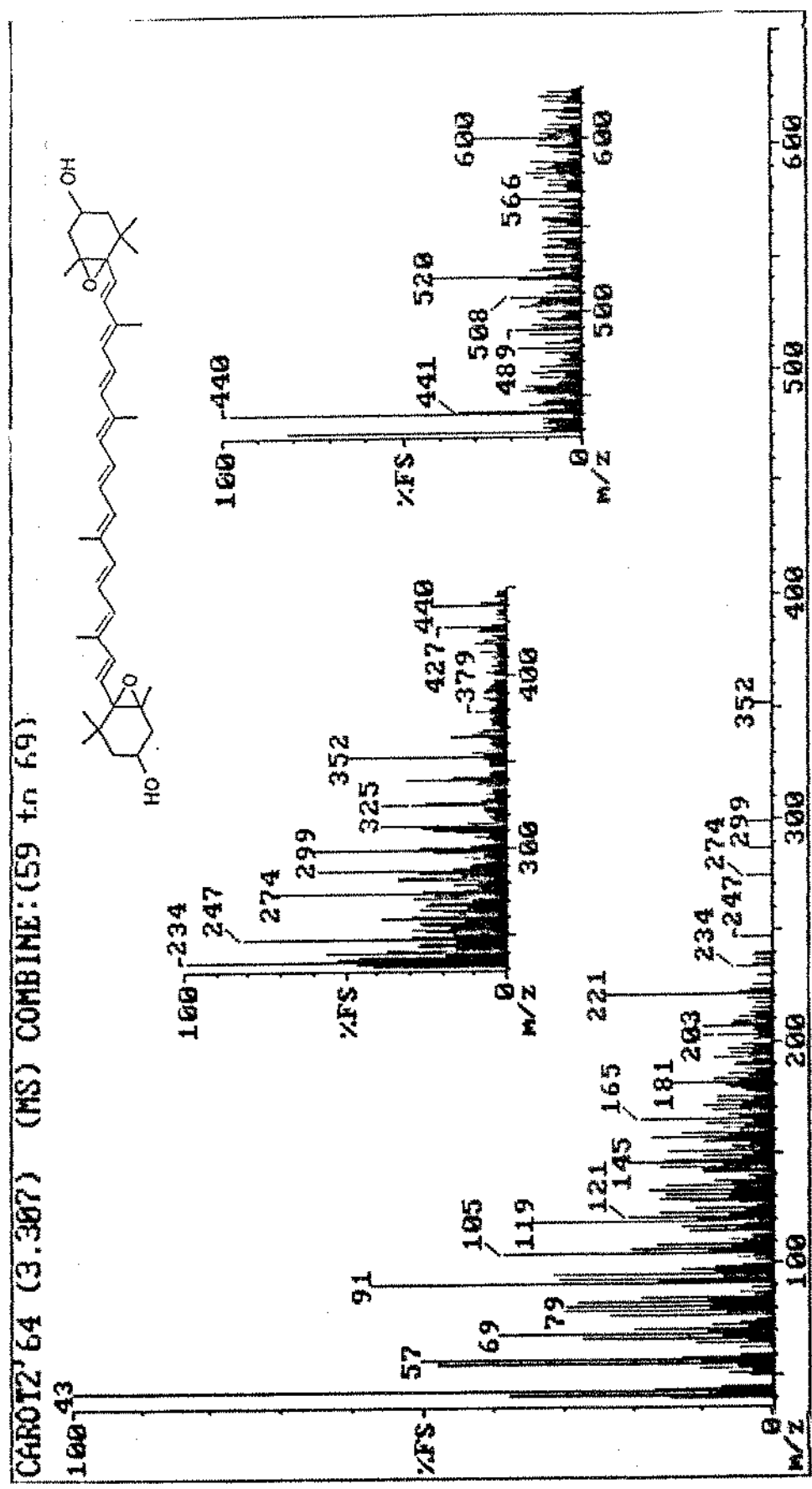


FIGURA 27: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da violaxantina, isolada de manga.

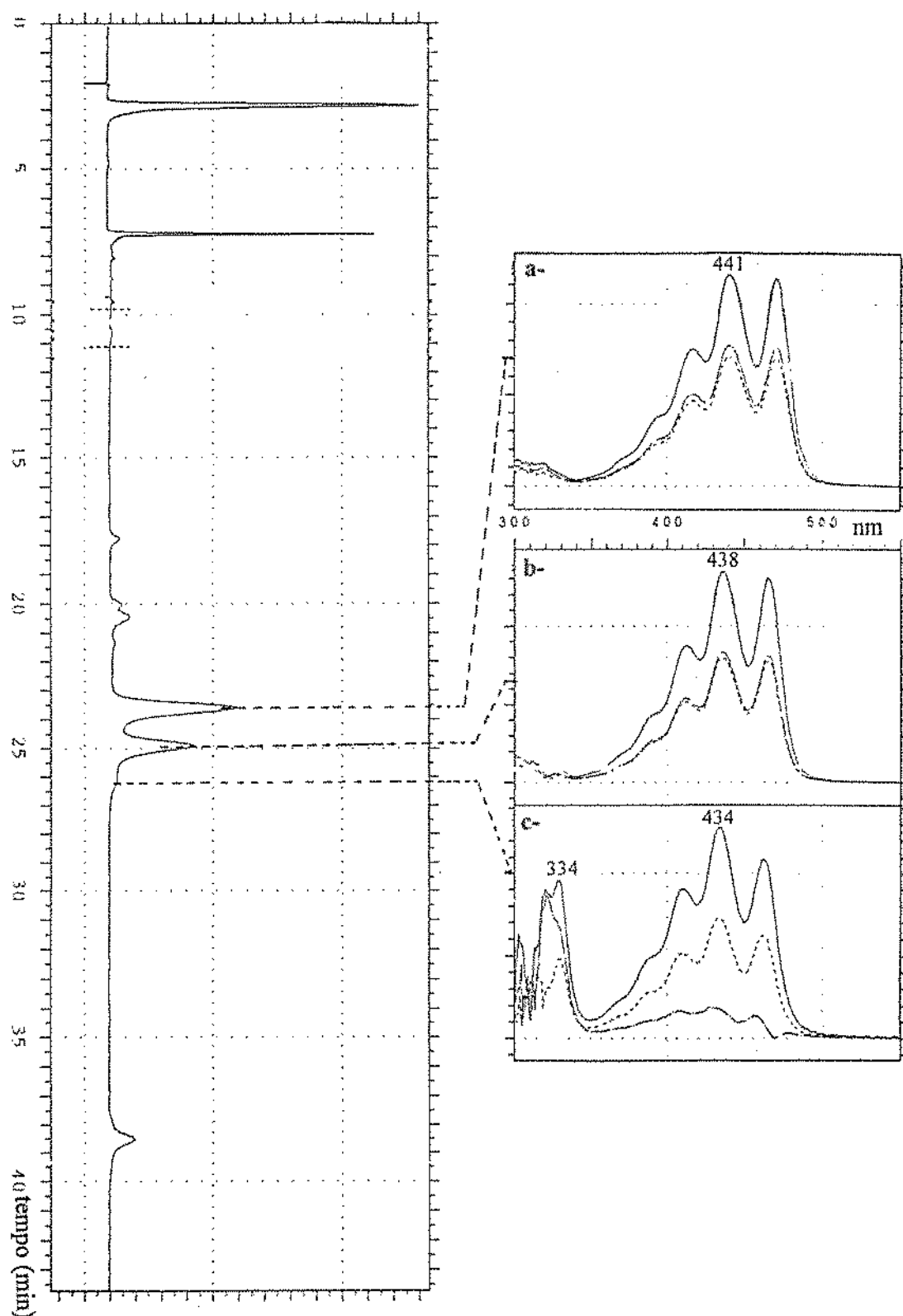


FIGURA 28: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de *a- trans-violaxantina*, *b- 9-cis-violaxantina* e *c- 13-cis-violaxantina*. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

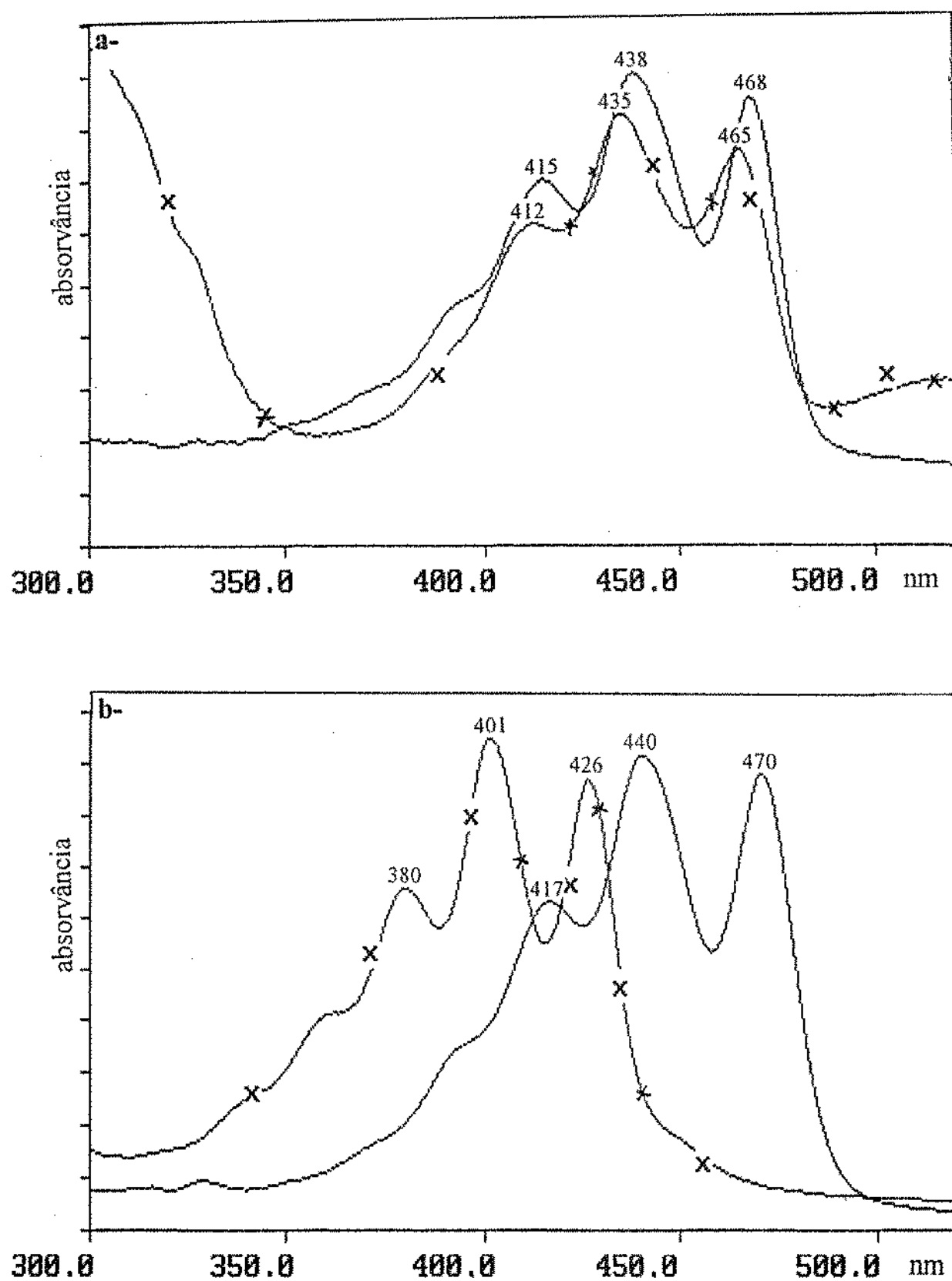


FIGURA 29: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da violaxantina em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (—x—) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (—x—).

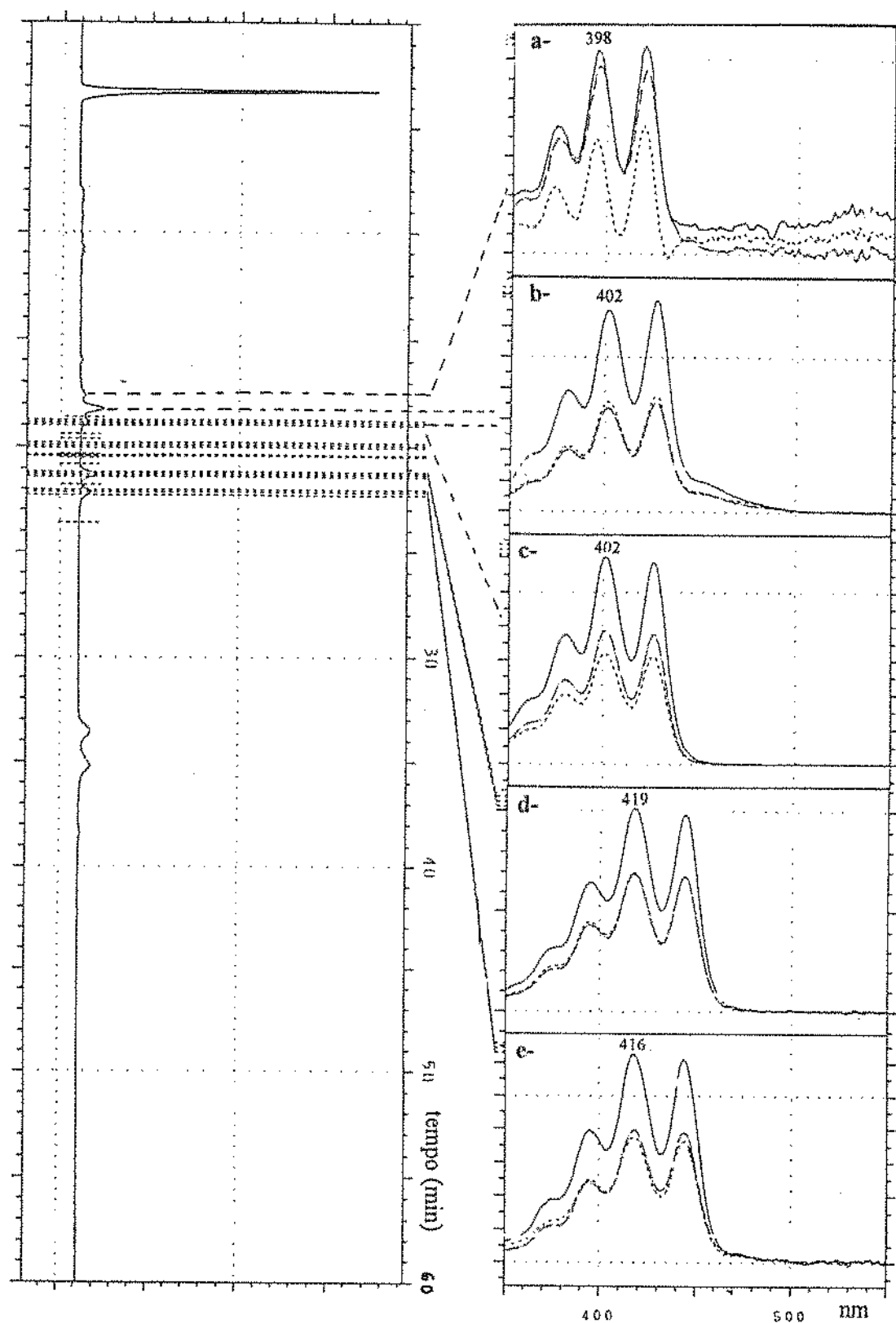


FIGURA 30: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, da fração de violaxantina, após adição de HCl 0,1N. Espectros a, b e c: rearranjo completo, espectros d e e: rearranjo incompleto.

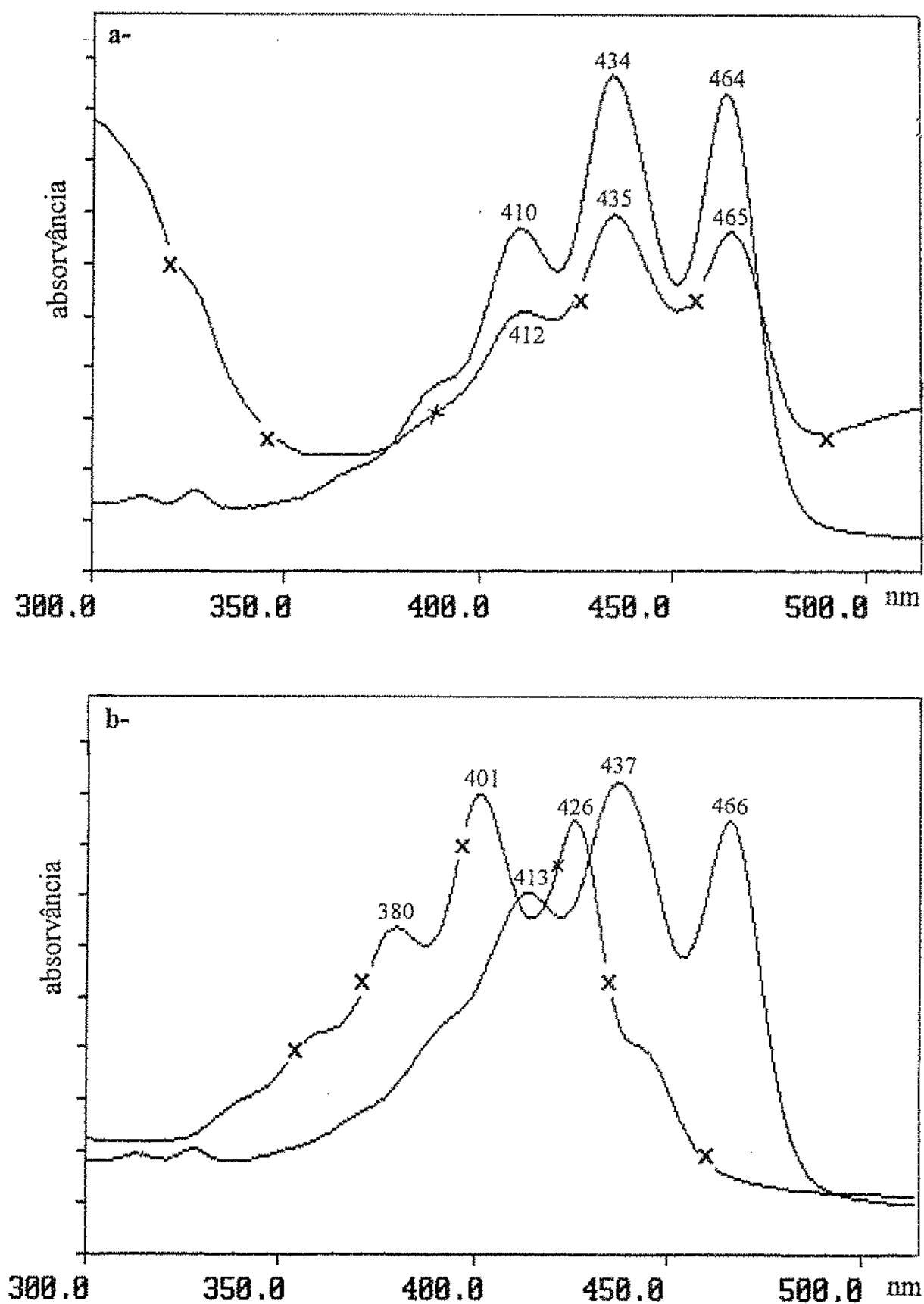


FIGURA 31: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da 9-*cis*-violaxantina em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (x) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (x).

O resultado da reação de isomerização monitorada por CLAE-DAD é de difícil interpretação porque, à exceção do rearranjo de epóxidos, não ocorrem mudanças significativas no t_R , havendo ainda isomerização simultânea das duas formas geométricas. Mesmo assim, houve um aumento na proporção dos isômeros *cis*, especialmente do pico 13, compatível com a redução da configuração *trans* (pico 11) que estava originalmente em maior quantidade (Figura 32).

As formas *cis* foram especulativamente identificadas como 9-*cis*-violaxantina (pico 12) e 13-*cis*-violaxantina (pico 13) com base na menor diferença entre os comprimentos de onda da *trans* e 9-*cis*- (3 nm no λ_{max}) e na ausência do pico *cis* na região UV. Já o isômero 13-*cis* apresentou maior diferença entre o seu λ_{max} e o do *trans* (6 nm) e pico *cis* a 365 nm (BRITTON, 1991). MÓLNAR & SZABOLCS (1980) também encontraram uma menor diferença (5 nm) entre a *trans*-violaxantina e isômero 9-*cis* do que entre as formas *trans* e 13-*cis* (8 nm) isoladas de *Viola tricolor*.

O espectro de massas da violaxantina (Figura 27) mostrou íon molecular de 600 u.m., correspondente à fórmula $C_{40}H_{56}O_4$, e fragmentos a m/e 564 (M-18-18) devido à eliminação de 2 grupos hidroxílicos, a m/e 520 (M-80) e a 440 (M-80-80), correspondente à perda de 1 e 2 grupos epóxidos, respectivamente. Os picos a m/e 352, 221 e 181 indicaram que os grupos epóxidos estão localizados em anéis com hidroxilas. O espectro de absorção, com λ_{max} 10 nm mais baixo que o do β -caroteno, indicou a presença de dois grupos epóxidos 5,6.

Neoxantina

Neoxantina (pico 15) e *cis*-neoxantina (pico 14) apresentaram os característicos espectros de absorção no visível, obtidos pelo DAD (Figura 33), com a forma *cis* apresentando λ_{max} menores que a *trans*. A isomerização aplicada ao extrato total, com monitoramento por CLAE, resultou na inversão da proporção dos isômeros (Figura 34). A presença de um grupo 5,6 epóxido foi comprovada pelo deslocamento hipsocrômico de 20 nm após adição de HCl diluído (Figura 35). A co-cromatografia foi feita com *cis*-neoxantina isolada de folhas, também, submetida às reações de isomerização (Figura 36a) e de rearranjo epóxido-furanóxido (Figura 36b), desta vez acompanhadas em espectrofotômetro.

Como a violaxantina, o espectro de massas da neoxantina (Figura 37) também apresentou íon molecular de 600 u.m.. Entretanto, a neoxantina foi facilmente identificada e distinguida da violaxantina devido a presença dos fragmentos característicos a m/e 582 (M-18), 564 (M-18-18), 520 (M-80) e 502 (M-18-80), sendo este último de maior intensidade relativa que o do íon molecular.

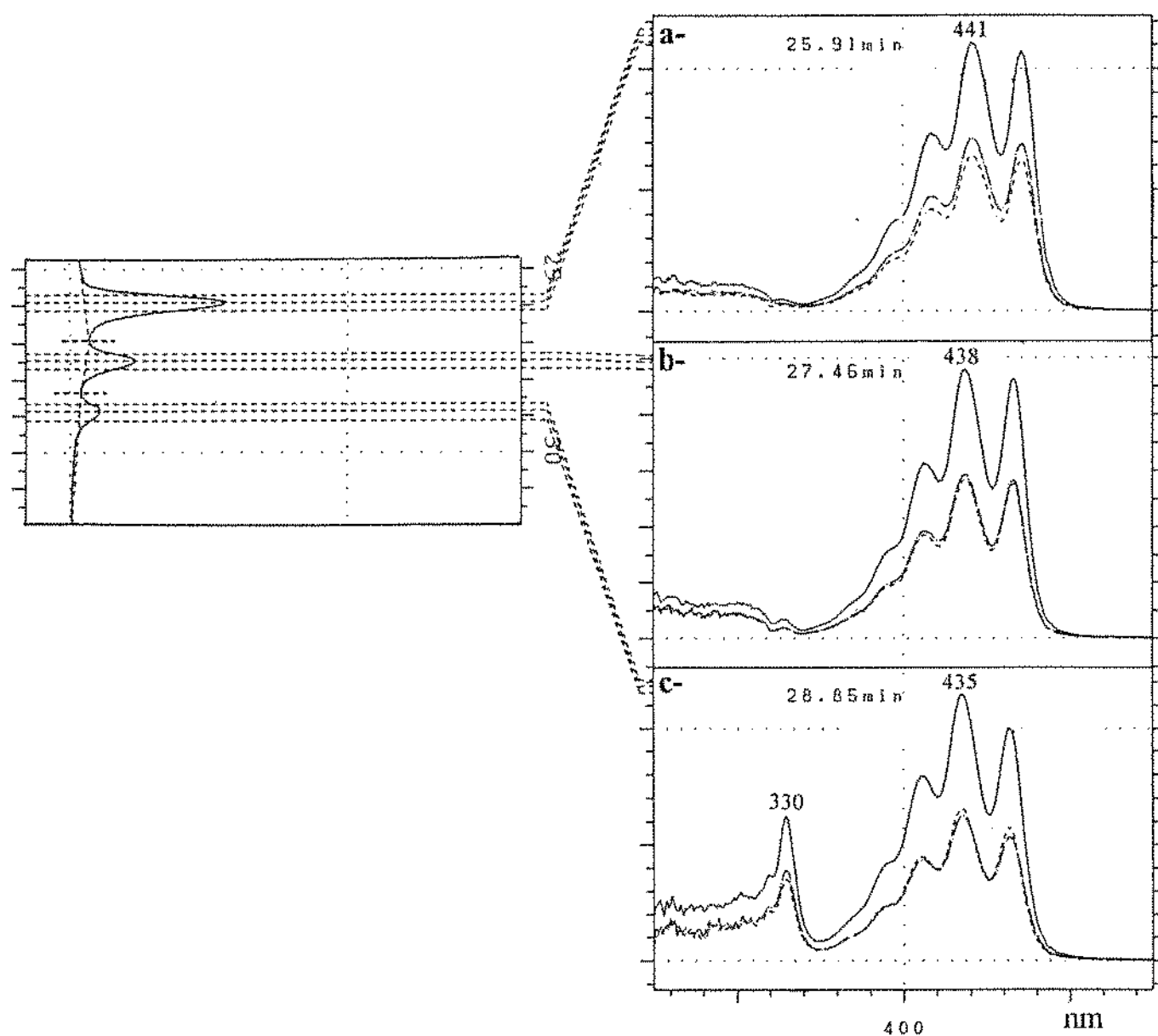


FIGURA 32: Cromatograma parcial, obtido por CLAE, enfocando violaxantina, do extrato de manga após reação de isomerização e espectros de absorção obtidos pelo DAD. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

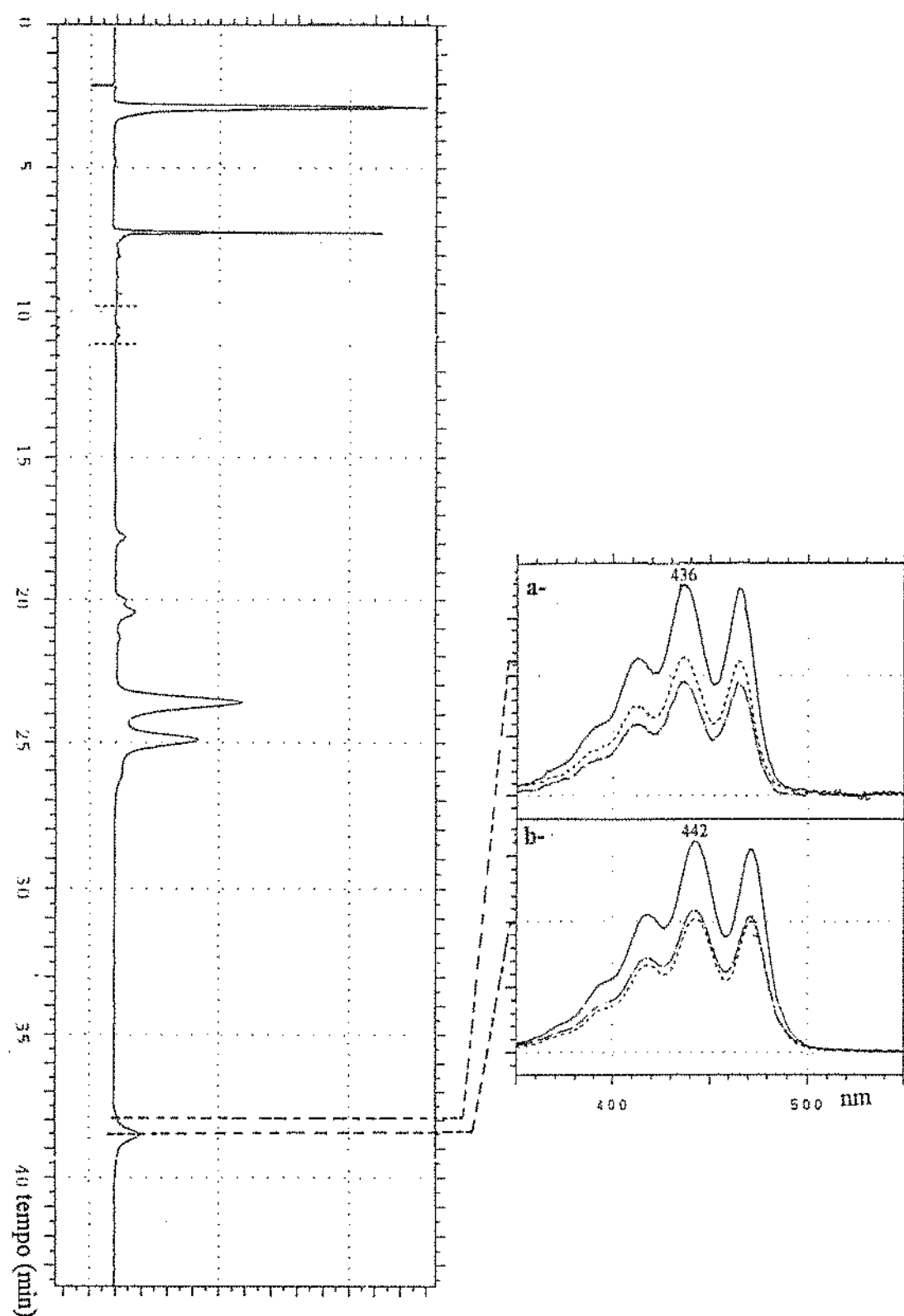


FIGURA 33: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, de a- *cis*-neoxantina e b- *trans*-neoxantina. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

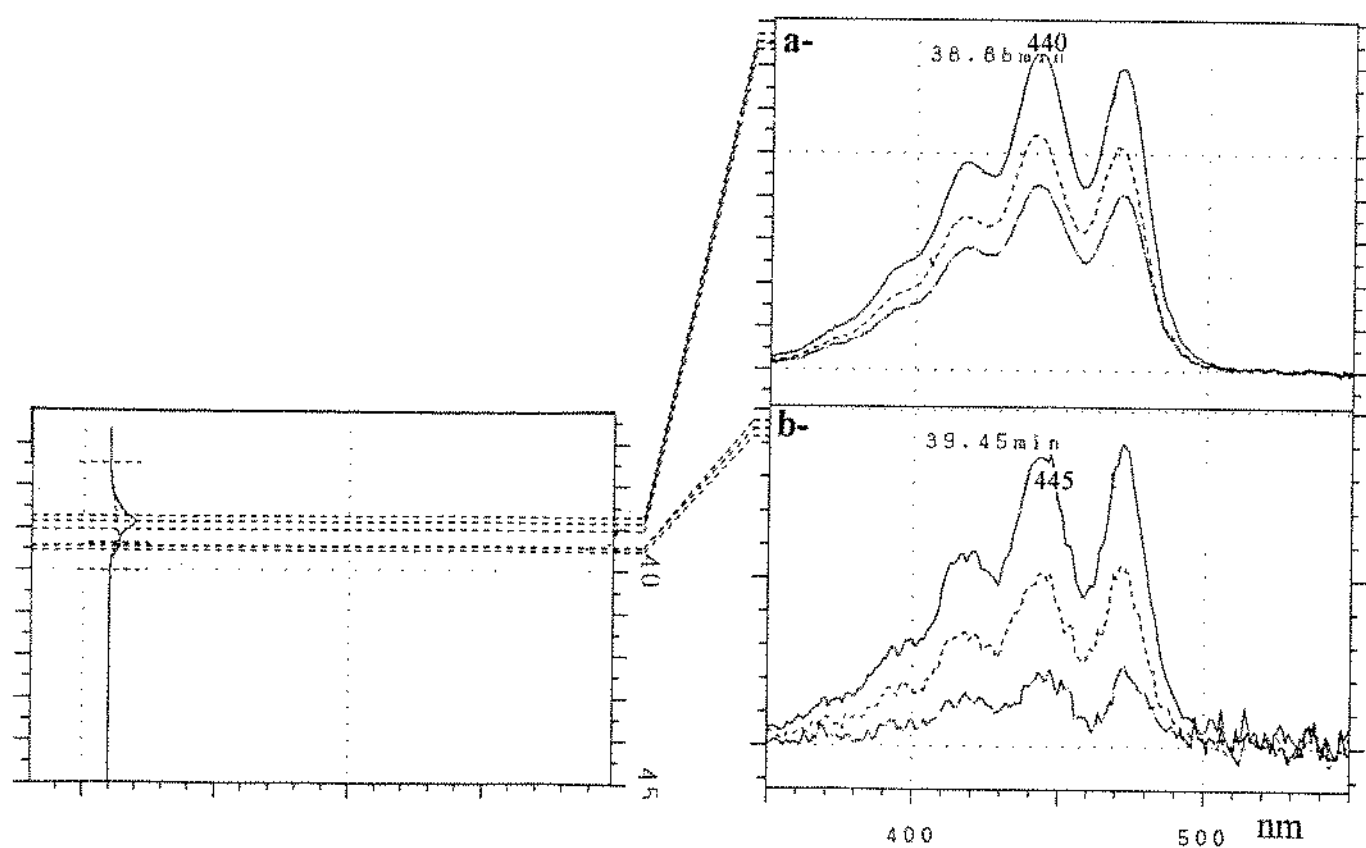


FIGURA 34: Cromatograma parcial, obtido por CLAE, enfocando neoxantina, do extrato de manga após reação de isomerização e espectros de absorção obtidos pelo DAD. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

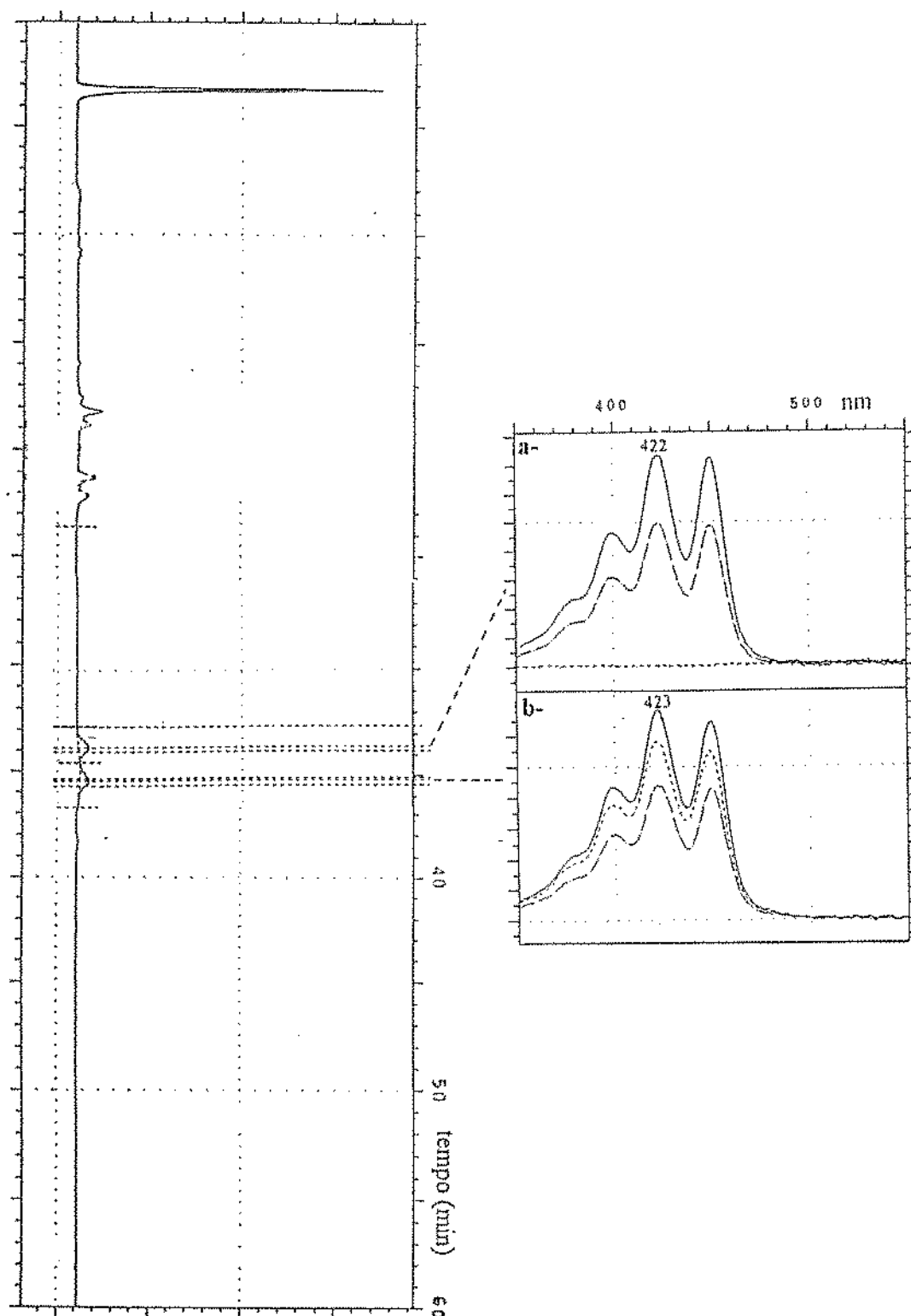


FIGURA 35: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de manga e espectros de absorção, obtidos pelo DAD, da fração de neoxantina após adição de HCl 0,1N. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

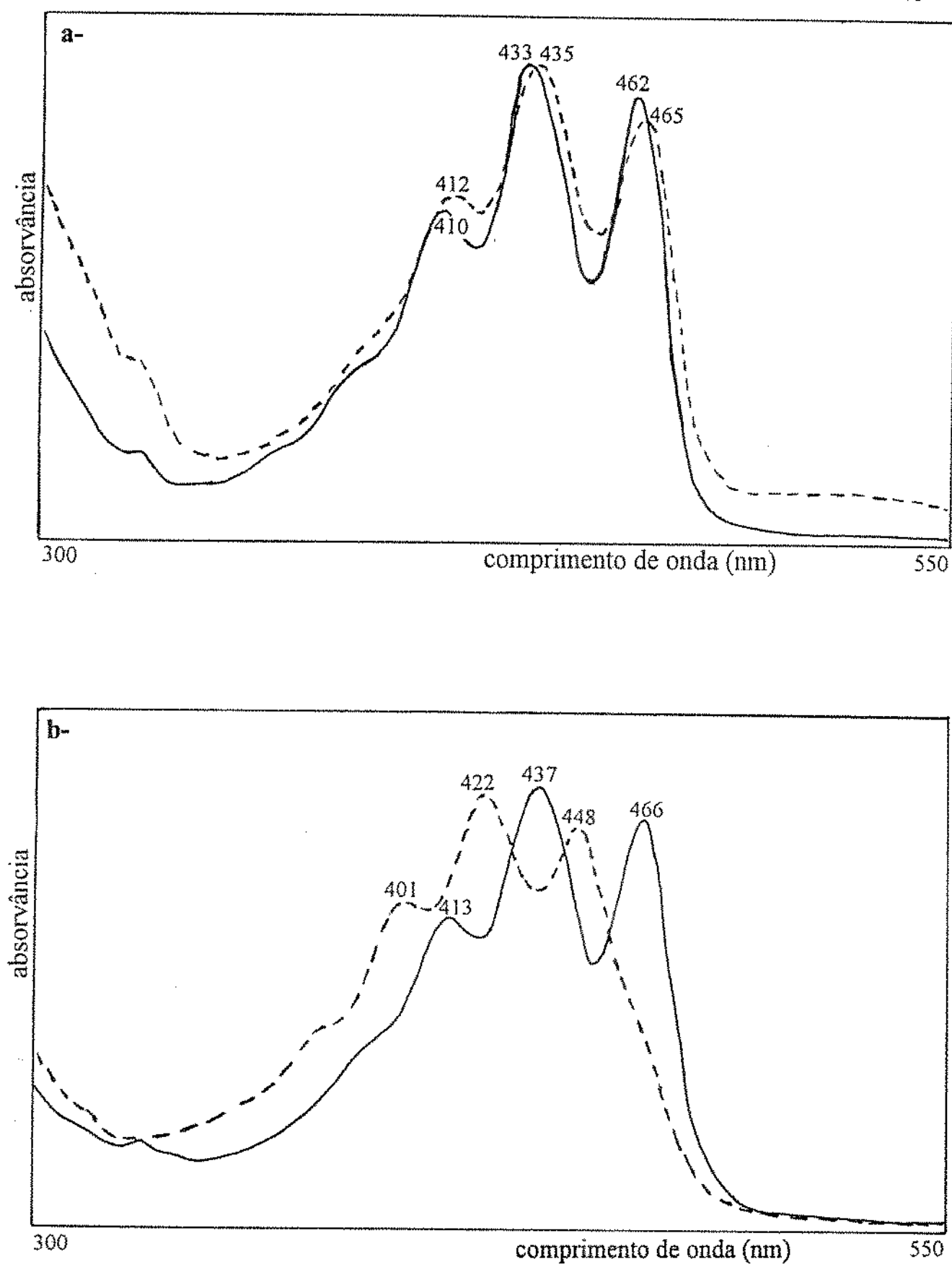


FIGURA 36: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, da *cis*-neoxantina isolada de couve em a- éter de petróleo (—) e após reação de isomerização (----) e b- etanol 95% (—) e após adição de HCl 0,1N (----).

Considerando a separação por CLAE e complementando com os carotenóides, presentes em traços, obtidos por CCD, foram identificados neste trabalho 13 carotenóides: β -caroteno, mutacromo, *cis*- β -criptoxantina, β -criptoxantina, zeaxantina, luteína, luteoxantina, *cis*-luteoxantina, violaxantina, 9-*cis*-violaxantina, 13-*cis*-violaxantina, *cis*-neoxantina e neoxantina.

Nota-se que todos os carotenóides previamente identificados com o uso conjunto de informações provenientes da CLAE-DAD (tempo de retenção, co-cromatografia e espectro no visível) e reações químicas específicas, tiveram suas identidades confirmadas por espectrometria de massas. Portanto, carotenóides comuns, com estruturas já bem estabelecidas, podem ser identificados pelo uso criterioso e cuidadoso do conjunto de informações fornecidos pelo comportamento cromatográfico (tempo de retenção e co-cromatografia), pelo espectro de absorção no visível e por reações químicas específicas, mesmo sem EM. Cabe ressaltar que a EM não fornece a forma geométrica do carotenóide e que a determinação da sua configuração com reação de isomerização monitorada por CLAE só é possível para os carotenóides majoritários, quando a coluna é capaz de separar suas formas isoméricas, ou quando o carotenóide encontra-se numa única forma geométrica.

Uma vantagem da cromatografia em coluna clássica se deve à possibilidade de isolar quantidades suficientes de carotenóides para execução das reações acompanhadas por espectrofotômetro. As reações monitoradas por CLAE só podem ser úteis se forem realizadas com o extrato total, já que a obtenção de frações tornaria todo o procedimento impraticável.

Os carotenóides β -caroteno, mutacromo, luteoxantina, violaxantina e zeaxantina detectados neste estudo foram também encontrados por JUNGALWALA & CAMA (1963), JOHN *et alii* (1970) e GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989). *Cis*-violaxantina e criptoxantina foram relatados somente nas mangas cultivares Alphonso e Badami. A presença de auroxantina, relatada nos outros estudos, pode ser explicada pelas recromatografias utilizadas, que provocaram rearranjo dos dois grupos epóxidos 5,6 para 5,8. Como em nosso estudo a separação foi feita por CLAE, numa única corrida, tal rearranjo aparentemente não ocorreu e a auroxantina não foi encontrada. A utilização de placa de sílica básica, desde que a separação não seja demorada, também evita tal rearranjo.

Fitoeno e fitoflueno encontrados nas cultivares de manga da Índia (Alphonso e Badami) não foram detectados neste trabalho e nem por GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) nas 5 cultivares brasileiras estudadas.

JUNGALWALA & CAMA (1963) ainda reportaram 5,6 monoepóxi- β -caroteno, γ -caroteno, *cis* e *trans*-anteraxantina em manga cv. Alphonso. Além desses carotenóides, JOHN *et alii* (1970) detectaram criptoflavina e um carotenóide não identificado com λ_{max} em 450 nm. O elevado número de carotenóides encontrados nestes dois trabalhos pode ser devido à grande quantidade de amostra tomada para análise, além das várias recromatografias utilizadas. GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) relataram também a presença de ζ -caroteno e α -criptoxantina.

5.1.2. Composição quantitativa

A composição quantitativa dos carotenóides de manga foi determinada por CLAE. Considerando que a manga contém apenas um caroteno e uma série de xantofilas, ao contrário da prática comum, foi utilizada uma coluna de ciano. Além de uma separação bem melhor que a obtida pela coluna de C_{18} , a coluna de ciano também permitiu a utilização de Sudan como padrão interno, já que é bem separado das xantofilas. Cabe lembrar que o Sudan elui juntamente com as xantofilas poliidroxiladas na coluna de C_{18} .

5.1.2.1. Exatidão e precisão do método

Para avaliar o método de CLAE desenvolvido neste estudo, foi feita uma comparação com o método de RODRIGUEZ-AMAYA *et alii* (1988) para os dois principais carotenóides de manga (β -caroteno e violaxantina). Todas as etapas deste método escolhido para a comparação, que emprega coluna clássica, haviam sido previamente avaliadas (RODRIGUEZ-AMAYA *et alii*, 1988; KIMURA *et alii*, 1990; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Não houve diferença significativa, a nível de 1%, entre os teores de β -caroteno obtidos pelos dois métodos (Tabela 8). O teor de violaxantina proveniente da CLAE foi significativamente maior que o da coluna clássica a nível de 1%, mas não significativo a 5%. Entretanto, este resultado deve ser analisado com cautela, pois o valor obtido pela CLAE englobou todas as formas isoméricas da violaxantina (quantificadas como tal), enquanto o proveniente da coluna clássica foi composto por todas as xantofilas poliidroxiladas (calculadas como *trans*-violaxantina), já que não ocorreu separação entre elas na coluna clássica.

TABELA 8: Comparação dos teores de β -caroteno e violaxantina obtidos por cromatografia líquida por coluna clássica e por CLAE.

Carotenóide	Coluna clássica		CLAE	
	Média $\pm$ DP ^a	CV	Média $\pm$ DP ^a	CV
β -caroteno	15,1 $\pm$ 0,2 *	1,0	15,4 $\pm$ 0,5 *	3,3
violaxantina	23,8 $\pm$ 0,9 ^b *	3,6	29,5 $\pm$ 2,9 ^c **	9,9
TOTAL	38,9 $\pm$ 0,8		44,9 $\pm$ 3,2	

^aMédia e desvio-padrão de triplicatas.

^bContém, além de violaxantina, luteoxantina e neoxantina.

^cSoma dos isômeros *trans* e *cis* de violaxantina.

Médias apresentando diferentes símbolos (*,**) em uma mesma linha são significativamente diferentes ao nível de 1%.

DP: desvio-padrão, CV: coeficiente de variação.

Os coeficientes de variação (CV) obtidos na CLAE foram mais altos que os da coluna clássica. Deve-se considerar que as frações separadas por cromatografia líquida clássica são lidas diretamente no espectrofotômetro e as concentrações calculadas de acordo com a Lei de Beer, utilizando-se coeficientes de absorção tabelados. Em CLAE, uma curva de calibração deve ser construída para cada carotenóide e, além disso, as prováveis variações de temperatura e as várias manipulações poderiam aumentar o CV. Como na quantificação interna é necessário o cálculo de dois valores de área (do PI e do carotenóide), a precisão esperada é 1,4 vezes menor do que na calibração externa (SNYDER & KIRKLAND, 1979). Portanto, para carotenóides bem separados em coluna clássica, a precisão tende a ser melhor que a obtida por CLAE. WILBERG & RODRIGUEZ-AMAYA (1992) já haviam demonstrado este fato com bixina de urucum.

O CV encontrado por CLAE para β -caroteno (3,3 %) neste estudo está na mesma faixa dos relatados na literatura. STEWART (1977) reportou um CV de 4% para β -caroteno de laranja. No método de HSIEH & KAREL (1983) foram encontrados valores de CV, para β -caroteno, variando de 1,10% (em tomate) a 16,47% (em moranga), dependendo da concentração e carotenos presentes nas amostras. BUSHWAY & WILSON (1982) relataram em duas bateladas de cenoura "in natura", CV de 1,26 e 7,68% para concentrações de β -caroteno de 91 e 56 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Um CV maior (8,60%) foi encontrado para "blueberry" congelada, onde o β -caroteno estava presente somente em 0,14 $\mu\text{g/g}$.

Para a separação de epóxicarotenóides di- ou triidroxilados (violaxantina, luteoxantina, auroxantina, neoxantina), a vantagem da CLAE é evidente já que a coluna clássica não proporciona esta separação.

5.1.2.2. Comparação entre os dois cultivares

O principal carotenóide encontrado nas mangas cv. Tommy Atkins e Keitt, ambas provenientes da região de Araraquara, Estado de São Paulo, foi *trans*-violaxantina, seguido de 9-*cis*-violaxantina e β -caroteno (Tabela 9). Quantitativamente, houve uma variação entre lotes da mesma cultivar, dificultando, desta forma, a comparação entre cultivares. Mesmo assim, pode-se observar que *trans*-violaxantina, 9-*cis*-violaxantina, neoxantina e *cis*-neoxantina tendem a teores maiores na cv. Tommy Atkins. Por outro lado, a zeaxantina apresentou níveis maiores na cv. Keitt. A cv. Tommy Atkins apresentou teor de carotenóides totais 30% maior que a cv. Keitt.

TABELA 9: Composição de carotenóides (µg/g) e valor de vitamina A (ER/100g) das duas cultivares de manga, no estágio maduro.

Carotenóide	Cultivar Keitt						Cultivar Tommy Atkins		
	Bahia			São Paulo			São Paulo		
	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	Faixa	M ± DP ^a	M ± DP ^a
<i>trans</i> -β-caroteno	13,4 - 16,2	15,1 ± 1,5	4,9 - 8,1		6,7 ± 1,6	3,4 - 8,4		5,8 ± 2,5	
N.I.	0,2 - 0,2	0,2 ± 0,0	0,2 - 0,2		0,2 ± 0,0	ND			
<i>cis</i> -β-criptoxantina	tr - 0,1		tr - 0,1			tr - 0,2			
<i>trans</i> -β-criptoxantina	0,3 - 0,3	0,3 ± 0,0	0,1 - 0,2		0,2 ± 0,0	0,1 - 0,4		0,3 ± 0,1	
<i>trans</i> -zeaxantina	0,6 - 0,9	0,8 ± 0,2	0,5 - 1,1		0,8 ± 0,3	0,2 - 0,6		0,4 ± 0,2	
isômeros de luteoxantina	3,1 - 4,1	3,8 ± 0,6	2,5 - 2,9		2,7 ± 0,2	1,3 - 2,4		2,0 ± 0,6	
<i>trans</i> -violaxantina	18,2 - 23,9	21,1 ± 2,9	15,4 - 22,7		18,0 ± 4,0	16,5 - 32,8		22,4 ± 9,1	
9- <i>cis</i> -violaxantina	9,9 - 10,3	10,1 ± 0,2	6,0 - 8,8		7,2 ± 1,4	10,2 - 19,5		14,5 ± 4,7	
13- <i>cis</i> -violaxantina	1,3 - 1,5	1,4 ± 0,1	ND - tr			tr			
<i>cis</i> -neoxantina	tr - 0,2		0,1 - 0,5		0,3 ± 0,2	tr - 1,9			
<i>trans</i> -neoxantina	1,0 - 3,6	2,1 ± 1,3	0,9 - 2,6		1,9 ± 0,9	0,8 - 9,7		4,9 ± 4,5	
TOTAL	49,9 - 59,8	55,0 ± 5,0	32,6 - 46,8		38,0 ± 7,7	40,1 - 70,5		51,2 ± 16,8	
Valor de vitamina A	222 - 270	251 ± 26	82 - 135		112 ± 27	57 - 141		96 ± 42	

^aMédia e desvio-padrão (DP) de três lotes diferentes.

ER: equivalente de retinol

N.I.: não identificado; ND: não detectado; tr: traços

Comparando as duas cultivares pesquisadas neste estudo, pode-se verificar que a diferença encontrada neste estudo foi menor do que a relatada na literatura, para β -caroteno e carotenóides totais.

GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) analisaram cinco cultivares brasileiras e encontraram β -caroteno como o principal carotenóide, seguido da luteoxantina em três cultivares e da violaxantina nos outros dois. Como a separação dos epóxycarotenóides diidroxilados não foi conseguida em coluna clássica, estes autores recorreram à CCD de sílica para efetuar a separação, o que explica a detecção de auroxantina e o baixo teor de violaxantina encontrado. Entre as quatro cultivares provenientes de São Paulo, a diferença mais nítida recaiu no β -caroteno, com a cv. Extrema apresentando um teor quatro vezes maior que a cv. Haden.

5.1.2.3. Efeitos geográficos

Comparando a composição de carotenóides das mangas cv. Keitt provenientes de dois Estados de climas diferentes, a variação mais nítida também residiu no β -caroteno, duas vezes maior na manga procedente da Bahia do que na do Estado de São Paulo. Esta diferença foi refletida no valor de vitamina A já que o β -caroteno foi o principal carotenóide provitaminico A. *trans*-Violaxantina e 9-*cis*-violaxantina também apresentaram níveis maiores nas mangas da Bahia, aproximando-se dos níveis encontrados na cv. Tommy Atkins de São Paulo (Tabela 9). Os resultados indicam que efeitos climáticos podem superar as diferenças entre cultivares, com as frutas provenientes de regiões mais quentes contendo teores maiores de carotenóides.

Esta mesma tendência pode ser observada quando se compara a manga cv. Tommy Atkins proveniente de São Paulo, analisada neste trabalho, com a mesma cultivar proveniente do Mato Grosso estudada por GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1991), que apresentou teor de β -caroteno duas vezes maior que a proveniente de São Paulo. Praticamente o dobro do teor de β -caroteno foi encontrado por estes mesmos autores (GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA, 1994) para mangas cv. Haden da mesma região, quando analisadas em anos diferentes.

Resultados similares foram relatados em mamão cv. Solo (KIMURA *et alii*, 1991). Mamões provenientes da Bahia apresentaram maiores concentrações de β -caroteno, β -criptoxantina e licopeno que os de São Paulo. Excluindo o licopeno da cv. Tailândia, que continha o dobro do encontrado nas cv Solo e Formosa, a diferença decorrente da localização geográfica ultrapassou a variação entre cultivares.

THOMAS & JANVE (1975) também encontraram maiores diferenças no teor total de carotenóides entre mangas cv. Alphonso provenientes de dois Estados indianos do que entre mangas colhidas na mesma região em anos diferentes.

5.1.2.4. Mudanças durante o amadurecimento

Durante o amadurecimento, as frutas se tornam gradualmente amarelas, laranjas ou vermelhas enquanto ocorre, simultaneamente, a decomposição das clorofilas e a rápida síntese de carotenóides. Essa mudança está correlacionada com a conversão dos cloroplastos em cromoplastos (GROSS, 1987).

As Tabelas 10 e 11 apresentam a composição de carotenóides das cultivares Keitt e Tommy Atkins, respectivamente, em três estádios de maturação, demonstrando a influência do amadurecimento.

As maiores mudanças durante o amadurecimento da manga cv. Keitt aconteceram com o β -caroteno e a violaxantina. β -Caroteno mais que triplicou, aumentando de 1,7 $\mu\text{g/g}$ na manga verde para 4,2 na parcialmente madura e 6,7 $\mu\text{g/g}$ na madura. *trans*-Violaxantina, com médias de 5,4 e 11,2 $\mu\text{g/g}$ nos estádios verde e parcialmente maduro, respectivamente, alcançou 18,0 $\mu\text{g/g}$ na fruta madura. 9-*cis*-Violaxantina mudou de 1,7 $\mu\text{g/g}$ na fruta verde para 3,9 na parcialmente madura e para 7,2 $\mu\text{g/g}$ na madura. Houve ligeiro aumento dos teores de β -criptoxantina, zeaxantina, luteoxantina e neoxantina. Por outro lado, a pequena quantidade de 13-*cis*-violaxantina desapareceu com o amadurecimento. O conteúdo total de carotenóides aumentou de 12,3 na manga verde para 23,6 e 38,0 $\mu\text{g/g}$ nas frutas parcialmente madura e madura, respectivamente.

As transformações decorrentes do amadurecimento na cv. Tommy Atkins foram semelhantes às da cv. Keitt. β -Caroteno praticamente triplicou, iniciando com 2,0 no estágio verde e aumentando para 4,0 $\mu\text{g/g}$ na fruta parcialmente madura e 5,8 na madura. Com 6,9 $\mu\text{g/g}$ na fruta verde, *trans*-violaxantina atingiu 17,5 $\mu\text{g/g}$ na manga parcialmente madura e 22,4 $\mu\text{g/g}$ na madura. A 9-*cis*-violaxantina aumentou de 3,3 $\mu\text{g/g}$ para 9,0 e 14,5 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, para as frutas parcialmente madura e madura. Luteoxantina e *trans*-neoxantina aumentaram do fruto verde para parcialmente maduro, diminuindo na manga madura. β -Criptoxantina e *cis*-neoxantina aumentaram ligeiramente. A exemplo da cv. Keitt, 13-*cis*-violaxantina também

TABELA 10: Composição de carotenóides (µg/g) e valor de vitamina A (ER/100g) da manga , cultivar Keitt, do Estado de São Paulo, em três estádios de maturação.

Carotenóide	Verde		Parcialmente madura		Madura	
	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^a
<i>trans</i> -β-caroteno	1,4 - 2,0	1,7 ± 0,3	3,8 - 4,7	4,2 ± 0,4	4,9 - 8,1	6,7 ± 1,6
N.I.	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 - 0,2	0,2 ± 0,0
<i>cis</i> -β-criptoxantina	tr	—	ND - tr	—	tr - 0,1	—
<i>trans</i> -β-criptoxantina	ND - tr	—	0,0 - 0,1	—	0,1 - 0,2	0,2 ± 0,0
<i>trans</i> -zeaxantina	0,2 - 0,3	0,3 ± 0,0	0,3 - 0,4	0,3 ± 0,0	0,5 - 1,1	0,8 ± 0,3
isômeros de luteoxantina	0,8 - 1,2	1,0 ± 0,2	1,3 - 2,0	1,6 ± 0,4	2,5 - 2,9	2,7 ± 0,2
<i>trans</i> -violaxantina	3,5 - 6,53	5,4 ± 1,70	10,0 - 12,9	11,2 ± 1,5	15,4 - 22,7	18,0 ± 4,0
9- <i>cis</i> -violaxantina	1,3 - 2,0	1,7 ± 0,4	3,4 - 4,4	3,9 ± 0,5	6,0 - 8,8	7,2 ± 1,4
13- <i>cis</i> -violaxantina	0,3 - 0,4	0,3 ± 0,1	tr - 1,5	0,2 ± 0,3	ND - tr	—
<i>cis</i> -neoxantina	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 - 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 - 0,5	0,3 ± 0,2
<i>trans</i> -neoxantina	0,9 - 2,2	1,6 ± 0,6	1,6 - 2,6	1,9 ± 0,5	0,9 - 2,6	1,9 ± 0,9
TOTAL	8,6 - 14,6	12,3 ± 3,2	22,3 - 25,8	23,6 ± 1,8	32,6 - 46,8	38,0 ± 7,7
Valor de vitamina A	24 - 33	33 ± 13	63 - 78	70 ± 7	82 - 135	112 ± 27

^aMédia e desvio-padrão de três lotes diferentes.
ER: equivalente de retinol
N.I.: não identificado; ND: não detectado; tr: traços

TABELA 11: Composição de carotenóides (µg/g) e valor de vitamina A (ER/100g) da manga , cultivar Tommy Atkins, do Estado de São Paulo, em três estádios de maturação.

Carotenóide	Verde		Parcialmente madura		Madura	
	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^a
<i>trans</i> -β-caroteno	1,4 - 2,9	2,0 ± 0,8	3,1 - 4,8	4,0 ± 0,8	3,4 - 8,4	5,8 ± 2,5
N.I.	ND - tr	_____	ND - tr	_____	ND	_____
<i>cis</i> -β-criptoxantina	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	tr - 0,2	0,1 ± 0,1
<i>trans</i> -β-criptoxantina	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	ND - 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 - 0,4	0,3 ± 0,1
<i>trans</i> -zeaxantina	0,2 - 0,3	0,3 ± 0,1	0,4 - 0,6	0,5 ± 0,1	0,2 - 0,6	0,4 ± 0,2
isômeros de luteoxantina	0,8 - 2,1	1,3 ± 0,7	1,8 - 3,9	2,7 ± 1,1	1,3 - 2,4	2,0 ± 0,6
<i>trans</i> -violaxantina	4,7 - 10,3	6,9 ± 3,0	9,8 - 22,1	17,5 ± 6,7	16,5 - 32,8	22,4 ± 9,1
9- <i>cis</i> -violaxantina	2,1 - 4,7	3,3 ± 1,3	5,4 - 11,5	9,0 ± 3,2	10,2 - 19,5	14,5 ± 4,7
13- <i>cis</i> -violaxantina	0,3 - 0,7	0,5 ± 0,2	tr - 1,4	0,7 ± 0,7	tr	_____
<i>cis</i> -neoxantina	ND - tr	_____	ND - 1,0	0,4 ± 0,5	tr - 1,9	1,0 ± 1,0
<i>trans</i> -neoxantina	1,2 - 4,6	2,6 ± 1,8	2,0 - 12,1	6,6 ± 5,1	0,8 - 9,7	4,9 ± 4,5
TOTAL	10,6 - 25,8	17,0 ± 7,8	23,7 - 65,1	45,1 ± 20,7	40,1 - 70,5	51,2 ± 16,8
Valor de vitamina A	24 - 49	33 ± 13	52 - 79	68 ± 14	57 - 141	96 ± 42

^aMédia e desvio-padrão de três lotes diferentes.
ER: equivalente de retinol
N.I.: não identificado; ND: não detectado; tr: traços

diminuiu com o amadurecimento. O total de carotenóides que foi 17,0 $\mu\text{g/g}$ no estágio verde alcançou 45,1 $\mu\text{g/g}$ no parcialmente maduro e 51,2 $\mu\text{g/g}$ na fruta madura.

O aumento do total de carotenóides durante o amadurecimento da manga já havia sido reportado por outros autores, embora as concentrações encontradas tenham sido muito diferentes.

Em 1950, CHAUDHARY encontrou teores de carotenóides totais de 5,30 $\mu\text{g/g}$ no estágio verde e 23,12 $\mu\text{g/g}$ no completamente maduro, em mangas de variedade local do Paquistão.

Trabalhando com cultivares indianos, JOHN *et alii* (1970) relataram um aumento no teor de carotenóides totais de 0,41 a 89,2 $\mu\text{g/g}$ durante o amadurecimento de manga cv. Badami e de 9,55 a 158 $\mu\text{g/g}$ na cv. Alphonso (THOMAS, 1975).

MORGA *et alii* (1979) obtiveram valores no dia da colheita de 8,2 e 6,2, aumentando para 27,5 e 18,8 $\mu\text{g/g}$ após 7 e 6 dias, nos anos de 1975 e 1974, respectivamente, em manga cv. Carabao das Filipinas.

Em mangas provenientes da Tailândia, SPEEK *et alii* (1988) encontraram 0,62 e 0,10 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais e β -caroteno, respectivamente, no estágio verde e 3,33 e 0,63 $\mu\text{g/g}$ para estes mesmos carotenóides na fruta madura. Estes foram os menores teores reportados na literatura.

Quando a influência do amadurecimento é analisada em termos de porcentagem, mesmo calculadas através das concentrações absolutas, apenas pequenas transformações são notadas (Tabela 12). A mudança mais nítida foi a diminuição da neoxantina e da 13-*cis*-violaxantina.

Estes resultados demonstram a vantagem de se realizar a avaliação do amadurecimento em termos das concentrações e não das proporções relativas como foi feito em muitos trabalhos. Também indicam que as mangas verdes analisadas, encontravam-se no ponto apropriado para colheita, com o sistema biológico para a biossíntese dos carotenóides já estabelecido. Assim, a mudança observada no amadurecimento ficou restrita apenas ao acréscimo da biossíntese.

A quantidade relativa de β -caroteno aumentou muito pouco durante o amadurecimento da manga cv. Keitt (de 14 a 18%) e se manteve constante na cv. Tommy Atkins (12 a 11%). Houve um pequeno aumento na porcentagem de

TABELA 12: Mudanças nas porcentagens dos carotenóides durante o amadurecimento da manga.

Carotenóide	cv. Tommy Atkins		cv. Keitt	
	Verde	Maduro	Verde	Maduro
β -caroteno	11,7	11,2	14,1	17,6
β -criptoxantina	0,4	0,5	0,1	0,4
zeaxantina	1,7	0,8	2,4	2,0
isômeros de luteoxantina	7,7	3,9	8,4	7,1
violaxantina	40,2	43,7	44,3	47,4
9- <i>cis</i> -violaxantina	19,5	28,3	13,9	19,0
13- <i>cis</i> -violaxantina	2,8	tr*	2,8	tr*
<i>cis</i> -neoxantina	tr*	1,8	0,5	0,7
neoxantina	15,5	9,5	12,9	5,1

*tr: traços

violaxantina durante o amadurecimento, de 40,2 a 43,7% na cv. Tommy Atkins e de 44,3 a 47,4% na Keitt. A quantidade relativa de 9-*cis*-violaxantina aumentou cerca de 1,4 vezes nas duas cultivares, enquanto que, a porcentagem relativa de isômero 13-*cis* diminuiu de 2,8% a traços nos dois cultivares.

5.2. Carotenóides do Suco de Manga

5.2.1. Composição qualitativa

O efeito do processamento térmico é exemplificado no suco de manga que apresenta perfil marcadamente diferente do observado nas mangas "in natura".

Foram encontrados 4 carotenóides no suco da marca A e 3 nos sucos das marcas B e C. O cromatograma obtido por CLAE do extrato de suco de manga marca A encontra-se na Figura 38 e a Tabela 13 apresenta a identificação e características desses pigmentos.

Como todo o sistema cromatográfico foi o mesmo da análise de manga, o β -caroteno (pico 1) e β -criptoxantina (pico 4) foram identificados comparando-se os espectros no visível, fornecidos pelo DAD, e tempo de retenção com os resultados de manga "in natura". O pigmento não identificado (pico 3) apresentou as mesmas características do pigmento desconhecido de manga. Sudan I (pico 2) foi adicionado para uso como padrão interno. Auroxantina (pico 5) foi identificada comparando seu λ_{max} com valores da literatura (DAVIES, 1976; BRITTON, 1985). O espectro de absorção fornecido pelo DAD (Figura 39) apresentou λ_{max} 48 nm mais baixo que o do β -caroteno, e tempo de retenção na região dos diidroxilados com dois grupos epóxidos (violaxantina e luteoxantina), que indicaram a presença de duas hidroxilas e de dois grupos 5,8-epóxido.

A presença de auroxantina e ausência de violaxantina (pigmento encontrado em maior teor na manga fresca) nos sucos poderia ser justificada pela conversão de dois grupos 5,6-epóxido da violaxantina nas formas 5,8, presentes na auroxantina. Os sucos apresentaram pH 3,7 e Brix entre 9,5 e 11,5°Brix. A liberação dos ácidos orgânicos que acontece na desintegração das estruturas da manga na fabricação do suco já cria as condições necessárias para a transformação da violaxantina em auroxantina.

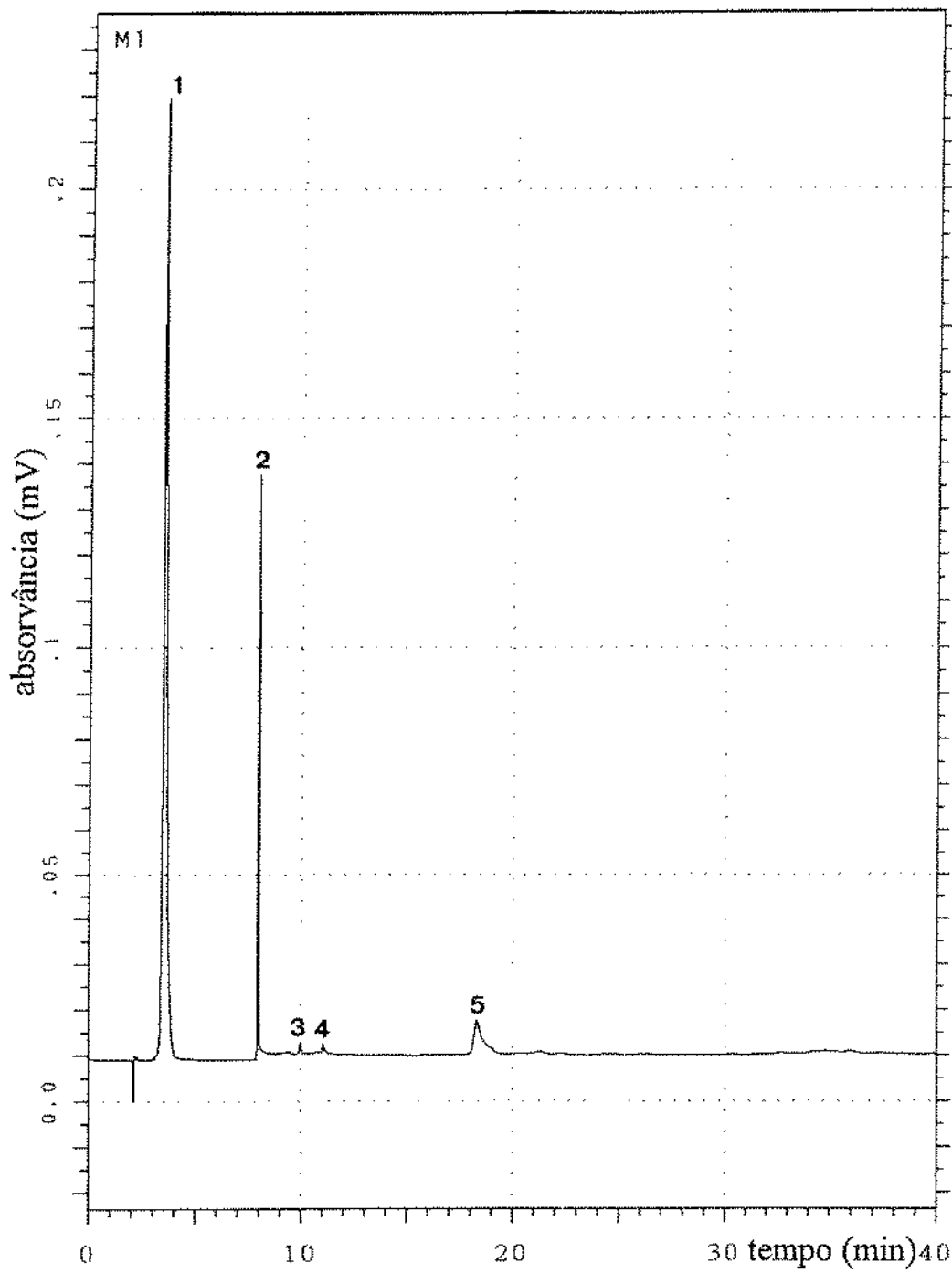


FIGURA 38: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato do suco de manga. A identidade dos picos encontra-se na Tabela 13. Condições cromatográficas: coluna de ciano e gradiente de acetona em n-hexano como fase móvel.

TABELA 13: Principais características, obtidas por CLAE, dos carotenóides do suco de manga.

Pico ^a	Identificação	Faixa t _R (min)	λ _{max} (nm) ^b
1	β-caroteno	3,12 - 3,54	(420) 450 475
2	Sudan I (P.I.)	6,72 - 7,44	_____
3	não identificado	9,18 - 10,03	_____
4	β-criptoxantina	10,70 - 11,12	(423) 450 480
5	auroxantina	17,28 - 18,38	380 402 427

^aNumeração de acordo com a Figura 38.

^bObtido pelo detector por arranjo de diodos. Valores entre parênteses indicam ombro no lugar de pico. Fase móvel: gradiente de acetona em n-hexano.

P.I.: padrão interno.

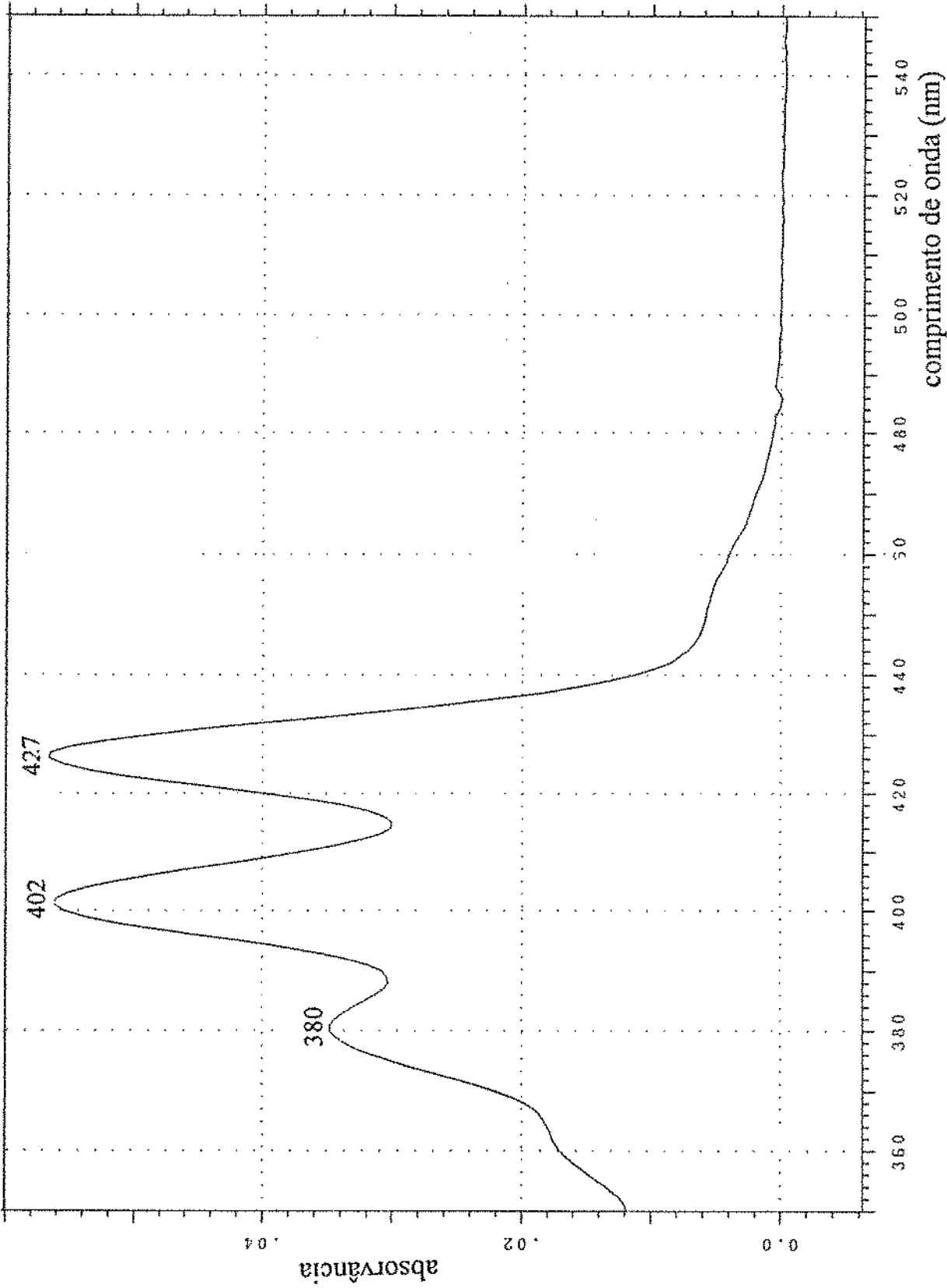


FIGURA 39: Espectro de absorção da auroxantina, obtido pelo DAD.

5.2.2. Composição quantitativa

Os teores de carotenóides e valor de vitamina A das três marcas comerciais de suco de manga encontram-se na Tabela 14.

O suco da marca **B** apresentou teores de β -caroteno e carotenóides totais bem maiores que os das marcas **A** e **C**. Já o teor de auroxantina foi maior no suco da marca **C** do que nos das **B** e **A**. Estes dados são indicativos do uso de diferentes matéria-prima e/ou tempo-temperatura de processamento.

Com o desaparecimento da violaxantina, carotenóide principal de manga "in natura", o β -caroteno tornou-se o carotenóide predominante do suco. O teor deste carotenóide nos sucos se situa dentro da faixa obtida para manga "in natura", comprovando a sua maior estabilidade em comparação com as xantofilas, particularmente com a violaxantina.

GODOY & RODRIGUEZ-AMAYA (1987) relataram, após o processamento de fatias de manga cv. Tommy Atkins, aumento significativo no teor de luteoxantina, devido à conversão do 5,6 em 5,8 epóxido e nenhuma alteração na quantidade de β -caroteno. No entanto, após o processamento do purê de manga cv. Ouro observou-se um decréscimo de 13% de β -caroteno e o aparecimento da auroxantina, que não havia sido detectada na fruta "in natura".

TABELA 14: Composição de carotenóides (µg/g) e valor de vitamina A (ER/100g) de três marcas do suco de manga.

Carotenóide	Marca A		Marca B		Marca C	
	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^a	Faixa	M ± DP ^b
β-caroteno	6,7 - 8,5	7,8 ± 0,9	10,3 - 13,0	11,7 ± 1,3	5,4 - 7,2	6,3 ± 1,3
N.I.	0,1 - 0,1	0,1 ± 0,0	ND	_____	ND	_____
β-criptoxantina	0,1 - 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 - 0,3	0,3 ± 0,0	0,1 - 0,2	0,2 ± 0,1
auroxantina	2,5 - 4,6	3,8 ± 1,1	5,7 - 6,0	5,8 ± 0,2	3,4 - 9,5	6,4 ± 4,3
TOTAL	10,9 - 13,4	11,9 ± 1,3	17,9 - 19,4	17,9 ± 1,5	9,0 - 18,0	13,5 ± 6,3
Valor de vitamina A	112 - 142	130 ± 16	172 - 217	196 ± 23	90 - 120	105 ± 21

^aMédia e desvio-padrão de três lotes diferentes.

^bMédia e desvio-padrão de dois lotes diferentes.

ER: equivalente de retinol.

N.I.: não identificado.

ND: não detectado

5.3. Carotenóides do Maracujá

Foram confirmados no maracujá variedade flavicarpa os seguintes carotenóides: fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, epóxi- β -caroteno, β -criptoxantina, β -citraurina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina.

5.3.1. Separação e purificação dos carotenóides

A Figura 40 apresenta o esquema da separação dos carotenóides de maracujá em coluna de alumina e isolamento em camada delgada. Apesar de todos os carotenóides previamente separados por CCD de sílica terem sido purificados em CD de MgO:kieselguhr, somente as placas de MgO onde verificou-se obtenção de mais que um carotenóide estão representadas na Figura 40.

A primeira fração, contendo os carotenóides menos polares, foi separada em seis bandas na placa de sílica (bandas 1.1 a 1.6). As bandas 1.2, 1.3 e 1.6 continuaram a aparecer como bandas únicas na CD de MgO. A fração 1.4 dividiu-se em 8 bandas de coloração fraca e a fração 1.1 separou em uma banda colorida e outra fluorescente (1.1.1). Da fração 1.5 somente duas manchas se apresentaram em maiores quantidades (1.5.1 e 1.5.2).

A fração de monoidroxilados, segunda da coluna, foi separada em três bandas na placa de sílica. A banda menos polar (2.1), quando purificada em CCD de MgO resultou em oito pigmentos de baixíssimas concentrações que, consequentemente, não puderam ser isolados. Os carotenóides das outras duas bandas (2.2 e 2.3) foram purificados separadamente em CD de MgO, apresentando uma banda principal cada.

Três bandas foram obtidas na CCD de sílica da terceira fração da coluna. Quando separada na CD de MgO, a banda 3.1 subdividiu-se em três pequenas, impossibilitando o seu isolamento. Da fração 3.2 foram obtidas duas bandas (3.2.1 e 3.2.2), e a banda 3.3 permaneceu única na CD de MgO.

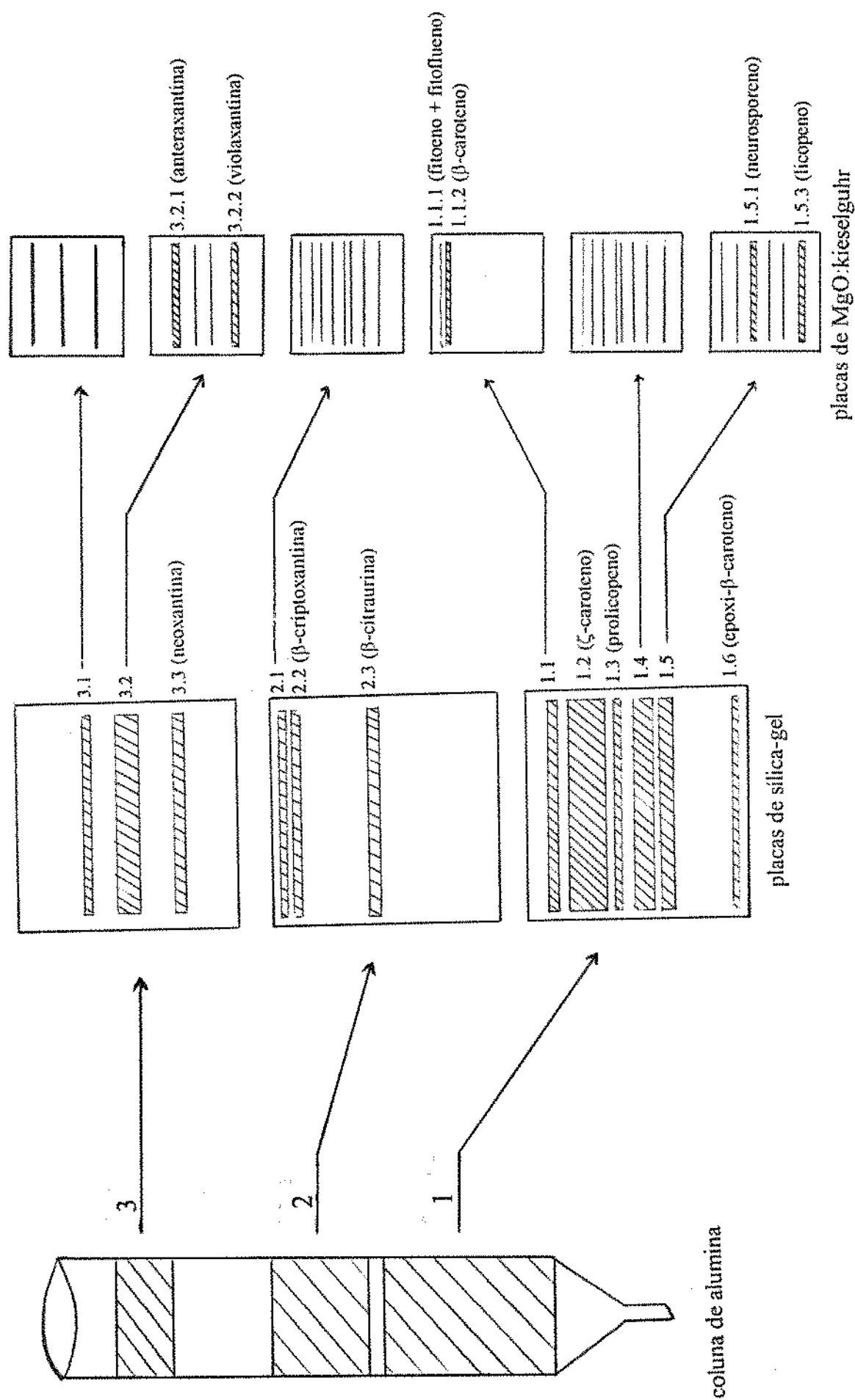


FIGURA 40: Separação e purificação dos carotenóides do maracujá.

5.3.2. Confirmação das estruturas por espectrometria de massas

Foram confirmados treze carotenóides em maracujá. Na Tabela 15 estão apresentados os dados fornecidos pelo espectro de massas, como íon molecular, principais fragmentos de massas característicos e porcentagem da intensidade relativa destes íons. Optou-se também, como no caso de manga, também por mostrar os espectros de massas. Os λ_{max} obtidos neste trabalho e os apresentados na literatura por DAVIES (1976) e BRITTON (1985) encontram-se na Tabela 16.

Licopeno e prolicopeno

O licopeno e o prolicopeno possuem espectros de massas (Figuras 41 e 42) muito semelhantes porque a alta temperatura (230°C) na câmara de ionização promove a isomerização, não sendo possível distinguir estes dois carotenóides por esta técnica. Os espectros apresentaram íon molecular de 536 u.m., fragmentos a m/e 69 (pico base) e a 467 (M-69), característicos da presença do grupo terminal Ψ . Acusaram também perda de tolueno (444, [M-92]⁺) e de m-xileno (430, [M-106]⁺) devido às eliminações da cadeia poliênica. O espectro de massas de licopeno obtido neste trabalho assemelha-se ao apresentado por VETTER *et alii* (1971).

A diferenciação entre estes dois pigmentos foi facilmente conseguida com auxílio do espectro de absorção no UV-visível, onde o prolicopeno apresentou um pico *cis* de alta intensidade na região UV e perfil de absorção no visível sem a usual definição dos três máximos (Figura 43). Após reação de isomerização, o espectro do prolicopeno apresentou forma e λ_{max} semelhantes aos do licopeno.

ζ -Caroteno

O ζ -caroteno pode aparecer em três formas: simétrica, não simétrica (com o sistema de duplas ligações deslocado para um dos lados) e configuração *cis*, em uma ou duas ligações duplas. O íon molecular de 540 u.m. e fragmentos de massa característicos a m/e 403 (M-137), 137 e 69 no espectro de massas (Figura 44) confirmaram o ζ -caroteno com estrutura simétrica. A maior abundância do pico de 94 u.m. (2,5%) em relação à eliminação de tolueno (M-92, 0,5%) indicou a presença de 7 duplas ligações conjugadas (ENZELL & BROMAN, 1994).

Neurosporeno

O espectro de massas do neurosporeno (Figura 45) apresentou íon molecular de 538 u.m. e principais fragmentos de massa a m/e 401 (M-137) e a 69 (pico base), característicos de seus grupos terminais. É interessante notar a presença de picos a m/e

TABELA 15: Fórmula molecular, razão *m/e* e abundância relativa (%) dos fragmentos de massascaracterísticos e íon molecular dos carotenóides do maracujá.

Fração das placas	Carotenóide	Fórmula molecular	<i>m/e</i> (% abundância relativa)	
			Fragmentos	Íon molecular
1.1.1	fitoeno	C ₄₀ H ₆₄	69 (97,6) 137 (100,0) 339 (37,8)	544 (19,7)
1.1.1	fitoflueno	C ₄₀ H ₆₂	69 (98,0) 95 (100,0) 137 (87,3) 337 (39,5) 405 (7,1)	542 (21,3)
1.2	ζ-caroteno	C ₄₀ H ₆₀	69 (100,0) 137 (55,7) 403 (17,6) 446 (2,5)	540 (55,3)
1.5.1	neurosporeno	C ₄₀ H ₅₈	69 (100,0)	538 (16,8)
1.1.2	β-caroteno	C ₄₀ H ₅₆	95 (100,0) 105 (95,3) 137 (41,6) 399 (1,6) 430 (1,5) 444 (22,0)	536 (60,8)
1.5.3	licopeno	C ₄₀ H ₅₆	69 (100,0) 430 (4,5) 444 (4,1) 467 (2,7)	536 (29,1)
1.3	prolicopeno	C ₄₀ H ₅₆	69 (100,0) 430 (3,6) 444 (4,9) 467 (2,3)	536 (21,9)
1.6	epóxi-β-caroteno	C ₄₀ H ₅₆ O	69 (100,0) 205 (44,8) 472 (5,5)	552 (3,6)
2.2	β-criptoxantina	C ₄₀ H ₅₆ O	119 (100,0) 442 (1,7) 460 (5,9) 534 (5,9)	552 (14,1)
2.3	β-citraurina	C ₃₀ H ₄₀ O ₂	105 (100,0) 239 (8,6) 279 (4,3) 414 (12,3)	432 (17,0)
3.2.1	anteraxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	55 (100,0) 221 (6,4) 352 (0,8) 584 (0,2) 504 (0,3) 566 (0,1)	584 (0,2)
3.2.2	violaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	105 (62,4) 181 (26,6) 221 (45,9) 352 (5,4) 440 (2,2) 520 (1,2)	600 (0,9)
3.3	neoxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	91 (100,0) 181 (36,7) 221 (65,9) 502 (2,6) 564 (1,5) 582 (0,8)	600 (0,7)

TABELA 16: Máximos de absorção de alguns carotenóides citados na literatura e dos identificados em maracujá.

Carotenóide	λ_{max} (nm)								
	Davies (1976) ^a			Britton (1985) ^a			Nossos resultados ^b		
fitoeno	276	286	298	276	286	297	277	287	299
fitoflueno	331	347	367	331	348	367	332	348	367
ζ -caroteno	378	400	425	378	400	425	378	400	425
neurosporeno	414	439	467	414	439	467	415	439	468
β -caroteno	(425)	448	475	(425)	449	476	(425)	450	476
licopeno	446	472	505	444	470	502	444	470	500
prolicopeno	—	—	—	(414)	436	(463)	(415)	436	(461)
epoxi- β -caroteno	—	—	—	—	—	—	405	430	455
β -criptoxantina	(425)	449	476	(425)	449	476	(425)	450	475
β -citraurina	—	—	—	—	450 ^c	—	—	446	—
anteraxantina	422	445	472	422	445	472	420	444	472
violaxantina	418	442	466	416	440	465	418	441	465
neoxantina	418	442	467	416	438	467	417	440	467

^a Éter de petróleo

^b Éter etílico

^c GROSS *et alii* (1975).

Valores entre parênteses indicam ombro no lugar de pico.

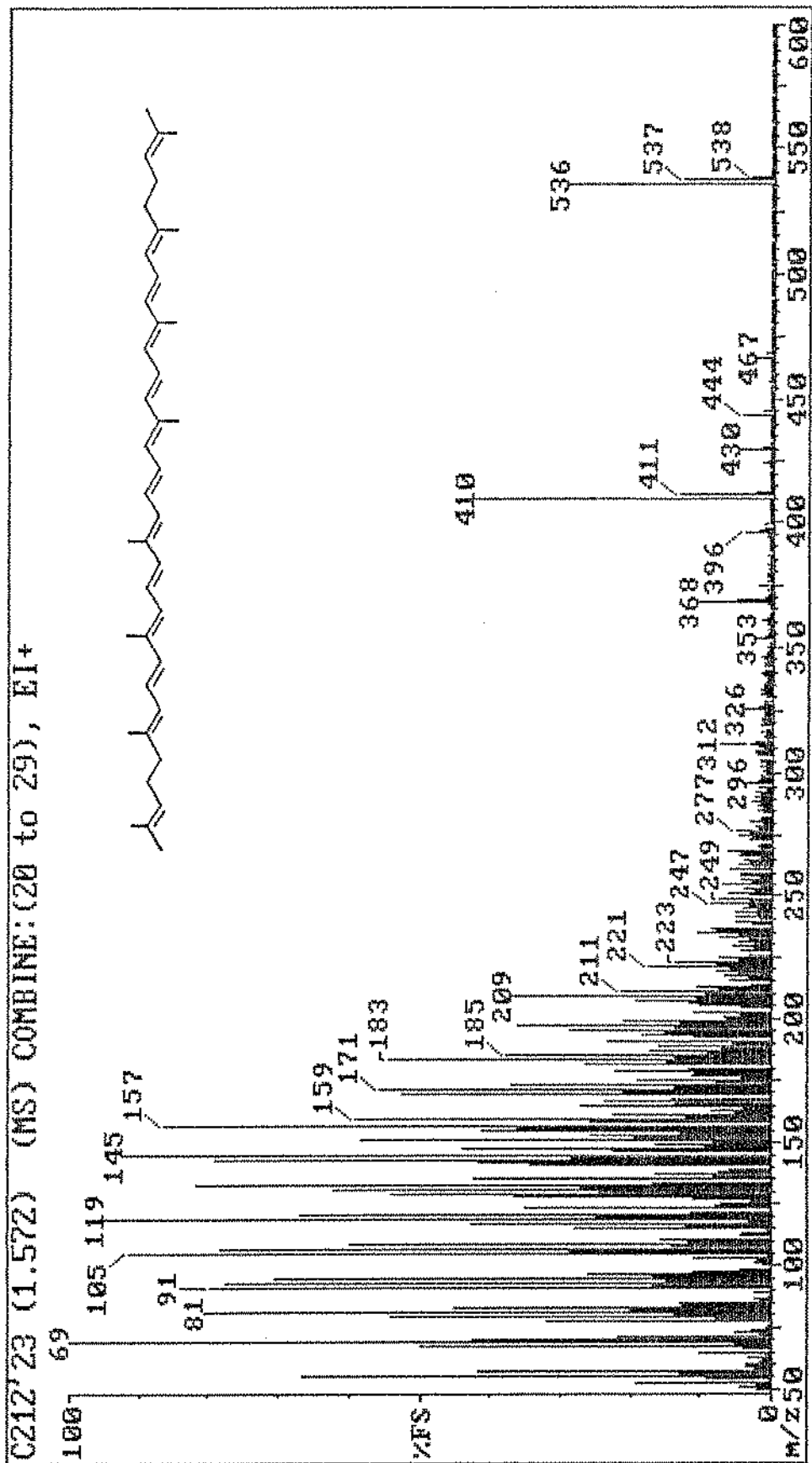


FIGURA 41: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do licopeno, isolado de maracujá.

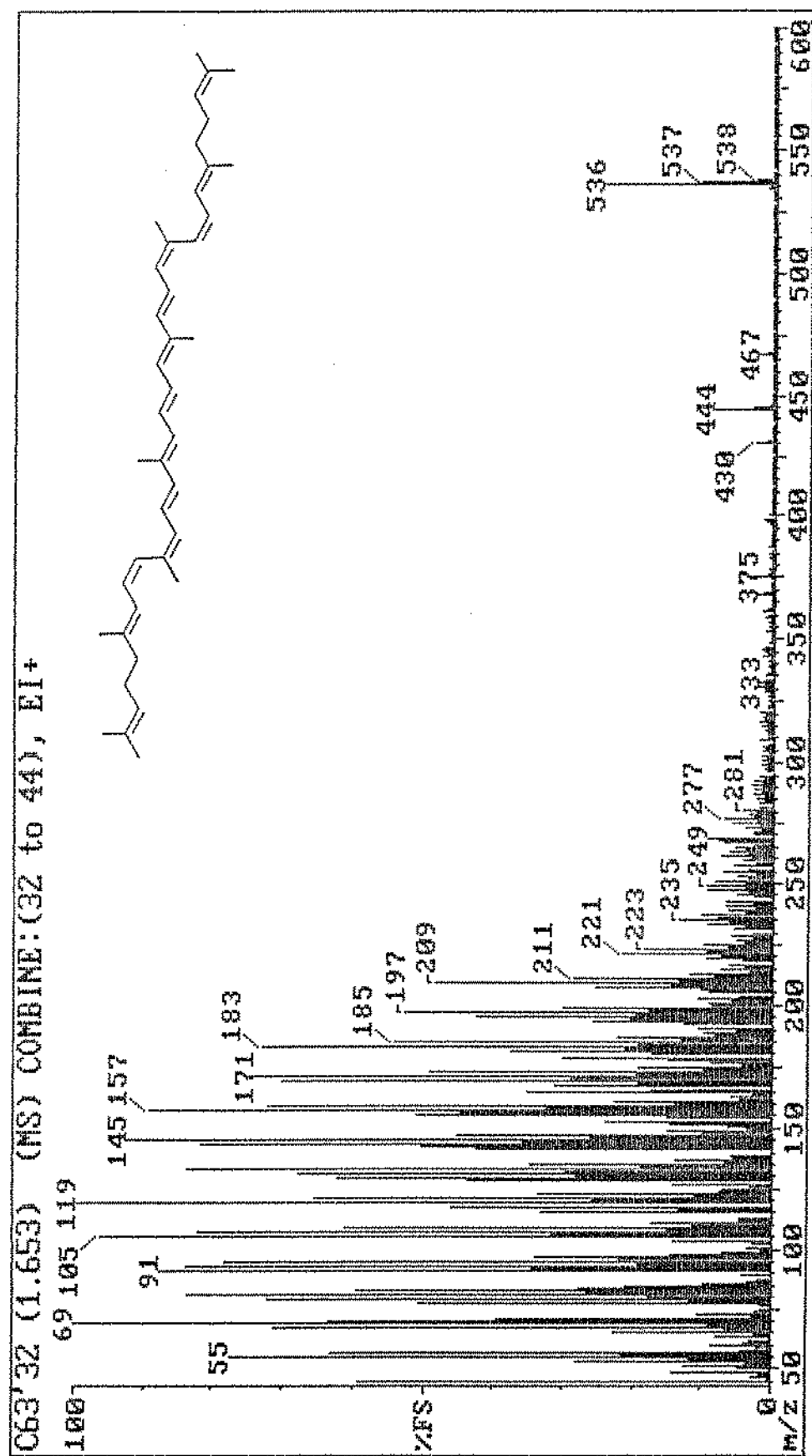


FIGURA 42: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do prolicopeno, isolado de maracujá.

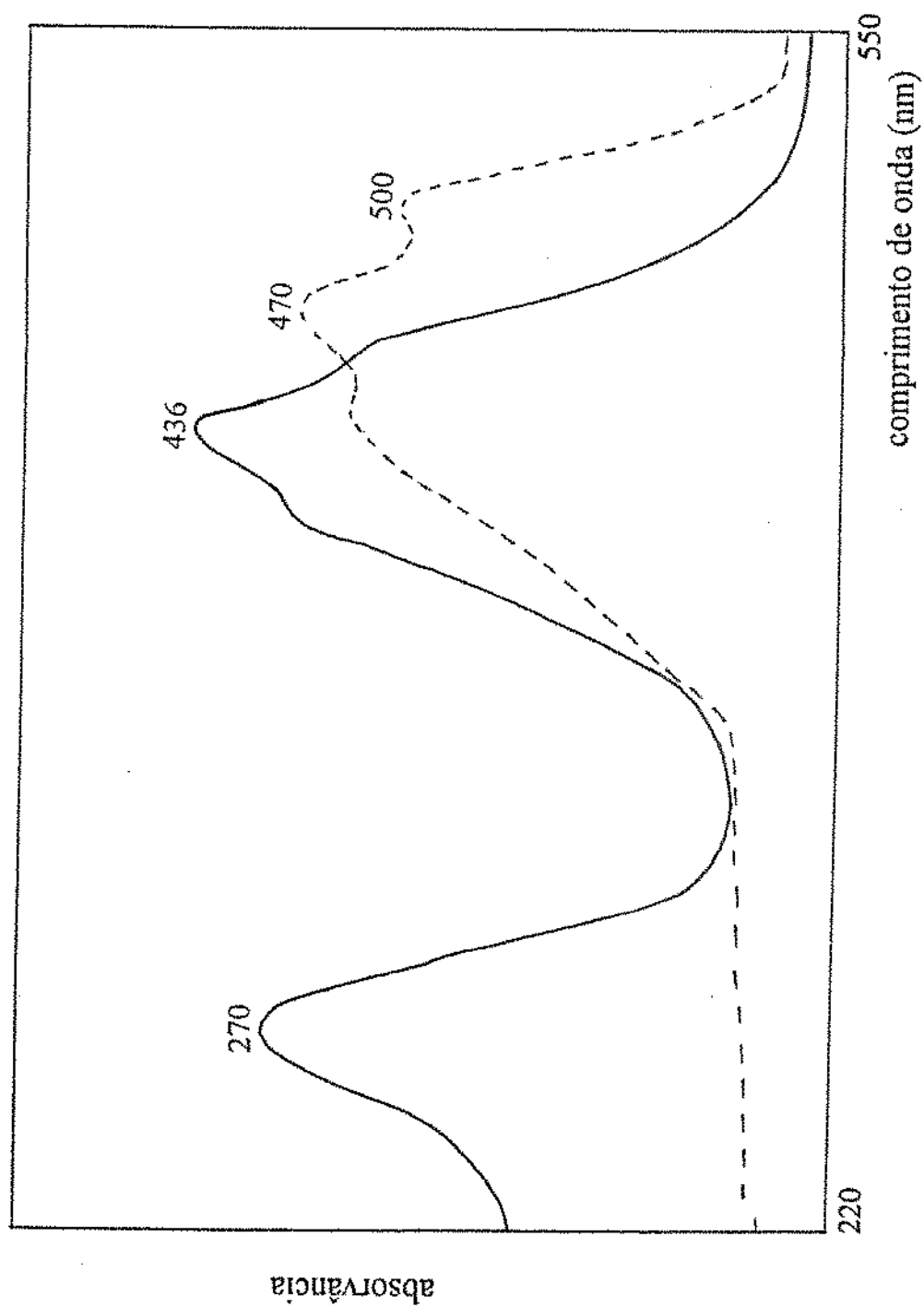


FIGURA 43: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, em éter etílico, do prolipope antes (—) e após reação de isomerização (----).

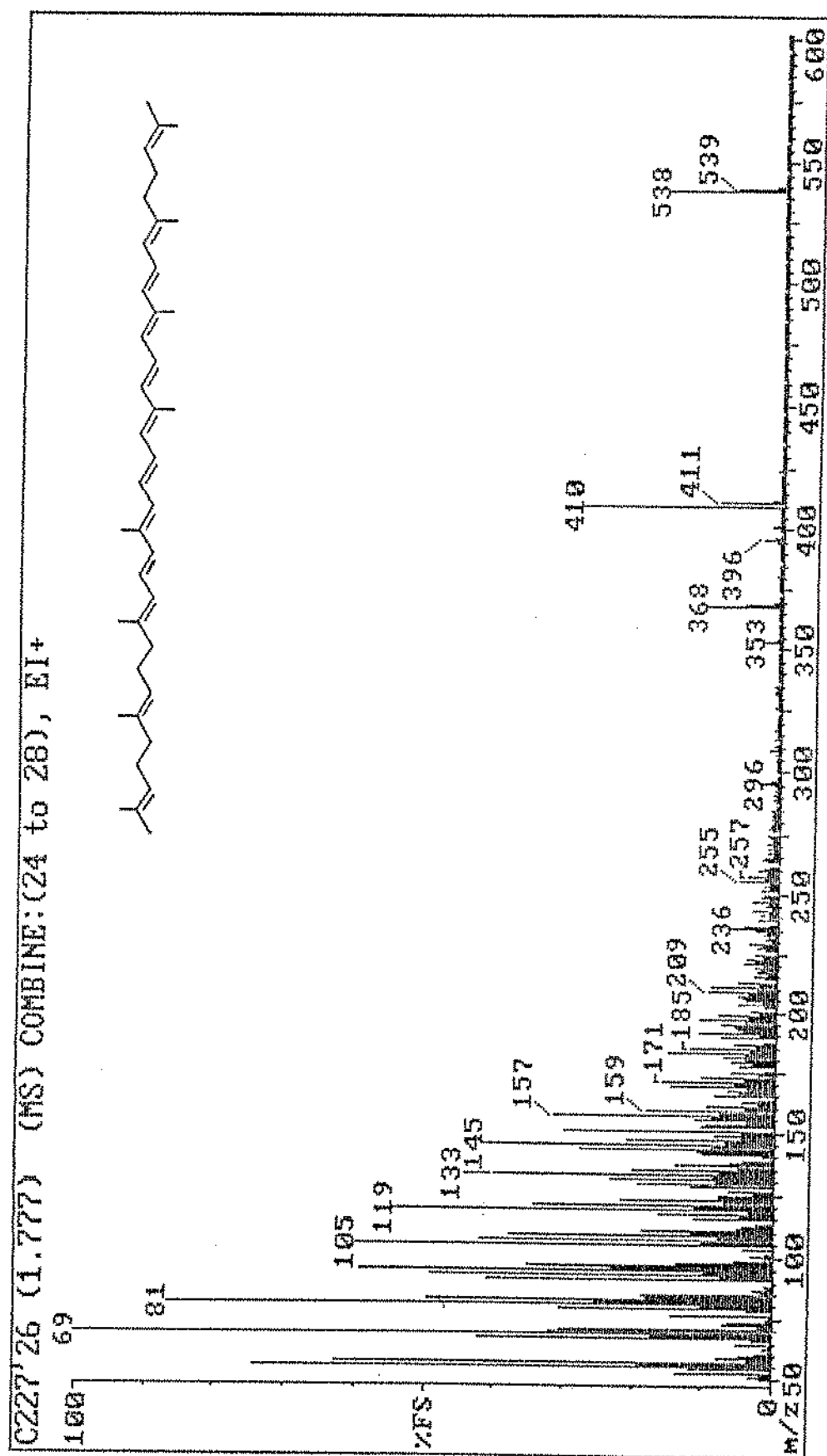


FIGURA 45: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) do neurosporeno, isolado de maracujá.

410 e 368 que apareceram também nos espectros de massas do licopeno, neurosporeno e anteraxantina. KHACHIK *et alii* (1989) relataram a presença do fragmento a m/e 410 nos espectros de massas do fitoeno e fitoflueno e a m/e 368 no do γ -caroteno sem, no entanto, discutir a sua procedência. ROSE (1982) apresentou um espectro de massas de licopeno, contaminado com esteróides, que exibía um fragmento a m/e 368 como pico base. Levando-se em conta estes fatos, pode-se considerar estes dois fragmentos como contaminantes, provenientes da amostra. Licopeno, neurosporeno e anteraxantina estavam presentes em baixas concentrações no maracujá.

A razão $[M-92]^+/[M-106]^+$ do ζ -caroteno (2,25), neurosporeno (1,25) e licopeno (0,94) decresceu à medida que aumentava o número de duplas ligações conjugadas de 7 para 9 e 11, respectivamente. Esta mesma tendência já havia sido obtida e discutida previamente por ENZELL *et alii* (1968); ENZELL (1969); FRANCIS (1972) e ENZELL & BROMAN (1994). Esta razão foi maior para o prolicopeno (1,36) do que para o licopeno, provavelmente devido às influências estéricas, embora esteja ainda incerta a importância relativa dos fatores estéricos versus eletrônicos (ENZELL & BROMAN, 1994).

Fitoeno e fitoflueno

O fitoeno e o fitoflueno, com 3 e 5 duplas ligações conjugadas respectivamente, foram localizados na camada de sílica pela fluorescência apresentada pelo fitoflueno sob radiação UV a 360 nm e coletados juntos. Devido a este fato, o espectro de massas da Figura 46 mostrou dois íons de massas altas (a m/e 542 e a 544). De qualquer modo, estes dois carotenóides foram rapidamente identificados de acordo com suas fragmentações características dos grupos 7,8-hidro- Ψ e 7,8,11,12-diidro- Ψ : a m/e 405 (M-137) e a 337 (M-205) para fitoflueno, a m/e 339 (M-205) para fitoeno e a m/e 69, 137 e 205, comuns aos dois carotenóides.

β -Caroteno e monoepóxi- β -caroteno

O β -caroteno foi confirmado por EM (Figura 47) como descrito anteriormente para o mesmo carotenóide proveniente de manga.

Apesar dos cuidados tomados para se evitar a contaminação, o espectro de massas do monoepóxi- β -caroteno, presente em traços, (Figura 48) apresentou sinais de contaminação provenientes de material plástico (a m/e 149) e da sílica (a m/e 515 e 530). No entanto, sua identidade pôde ser confirmada pelas características discutidas previamente para este carotenóide, isolado da manga.

β -Criptoxantina

A confirmação de β -criptoxantina se deu como descrita para a manga. Aliás, o espectro de massas da β -criptoxantina isolada de maracujá (Figura 49) foi de melhor qualidade que o de manga (Figura 21), provavelmente porque este pigmento estava presente em maior concentração no maracujá.

β -Citraurina

A identificação da β -citraurina foi baseada na presença do íon molecular de 432 u.m. e fragmentos a m/e 414 (M-18), indicando presença de um grupo hidroxílico, e a m/e 279 (M-153) e 239 (M-193) correspondente à perda do grupo terminal β -ionona com uma hidroxila (Figura 50). Após reação de redução (Figura 51), com transformação do composto aldeídico em álcool primário, o pigmento apresentou íon molecular a m/e 434 e perdas consecutivas de água (M-18 e M-18-18). O pigmento reduzido assumiu um espectro de absorção com maior definição dos máximos a 310, 421 e 446 nm, em éter etílico (Figura 52).

Anteraxantina

O íon molecular de 584 u.m., correspondente à fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_3$, e os fragmentos característicos correspondentes à perda de um grupo hidroxílico (566 u.m., M-18) e a presença de um grupo epóxido (504 u.m., M-80) em um anel com hidroxila (fragmentos a m/e 221 e 352) confirmaram a presença da anteraxantina (Figura 53). O espectro de absorção na região visível apresentou λ_{max} somente 3 nm mais baixo que o do β -caroteno, refletindo a presença do epóxido tipo 5,6 (Tabela 16).

Violaxantina e neoxantina

Violaxantina (Figura 54) e neoxantina (Figura 55) foram confirmadas por EM, como detalhado anteriormente, na confirmação dos carotenóides de manga.

Fitoflueno, ζ -caroteno e β -caroteno identificados neste estudo, foram também relatados por PRUTHI & LAL (1958), LEUENBERGER & THOMMEN (citado por GROSS, 1987) e CECCHI (1978). Além destes, CECCHI (1978) encontrou em maracujá neurosporeno e licopeno, também detectados neste estudo. Este autor relatou ainda a presença, com segundo ou terceiro maior teor dependendo do lote, de um caroteno não identificado com λ_{max} em éter de petróleo, a (410) 435 e 465 nm. Estes dados, inclusive o perfil do espectro de absorção, coincidem perfeitamente com os encontrados neste trabalho para o prolicopeno.

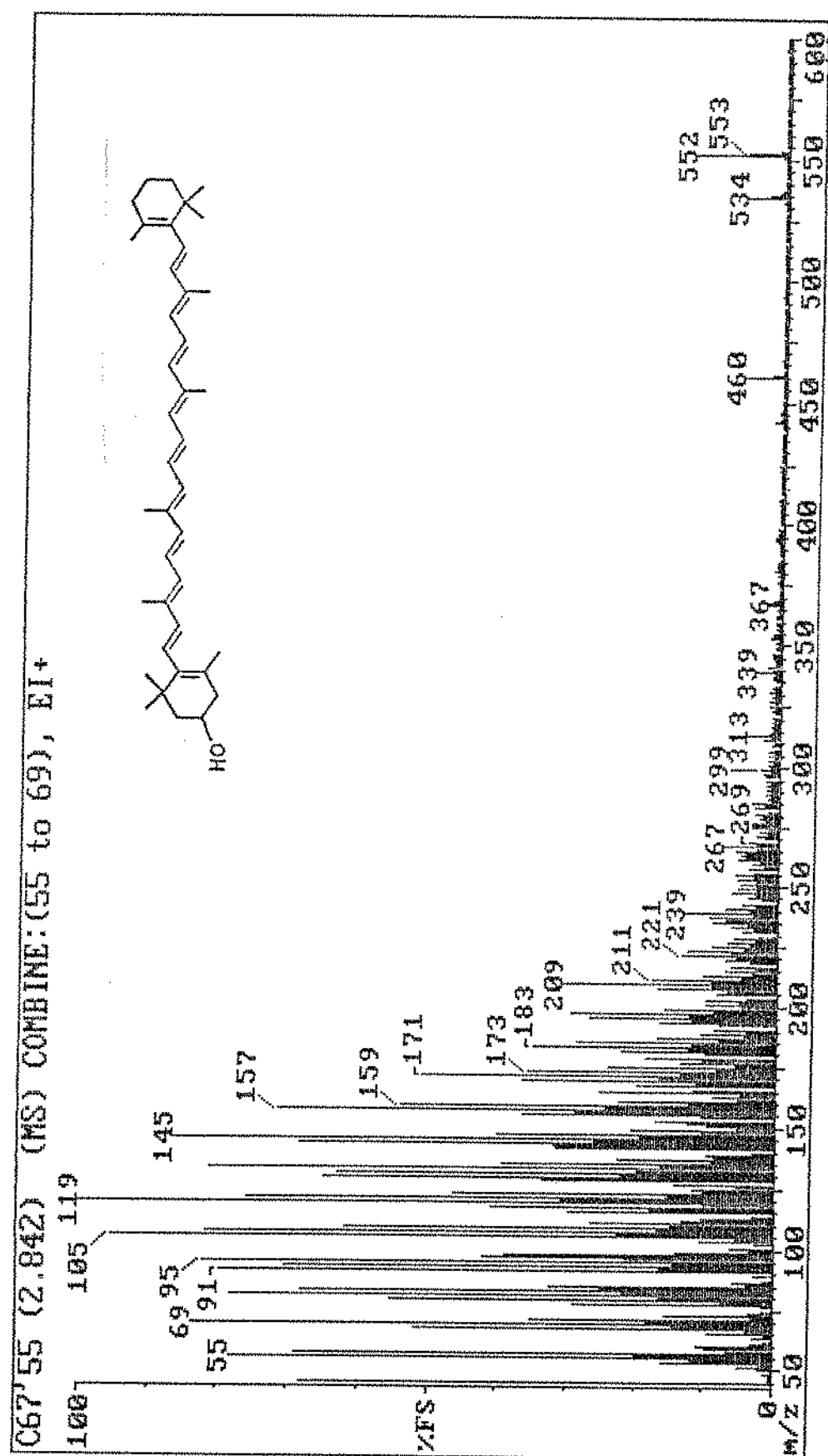


FIGURA 49: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da β -criptoxantina, isolada de maracujá.

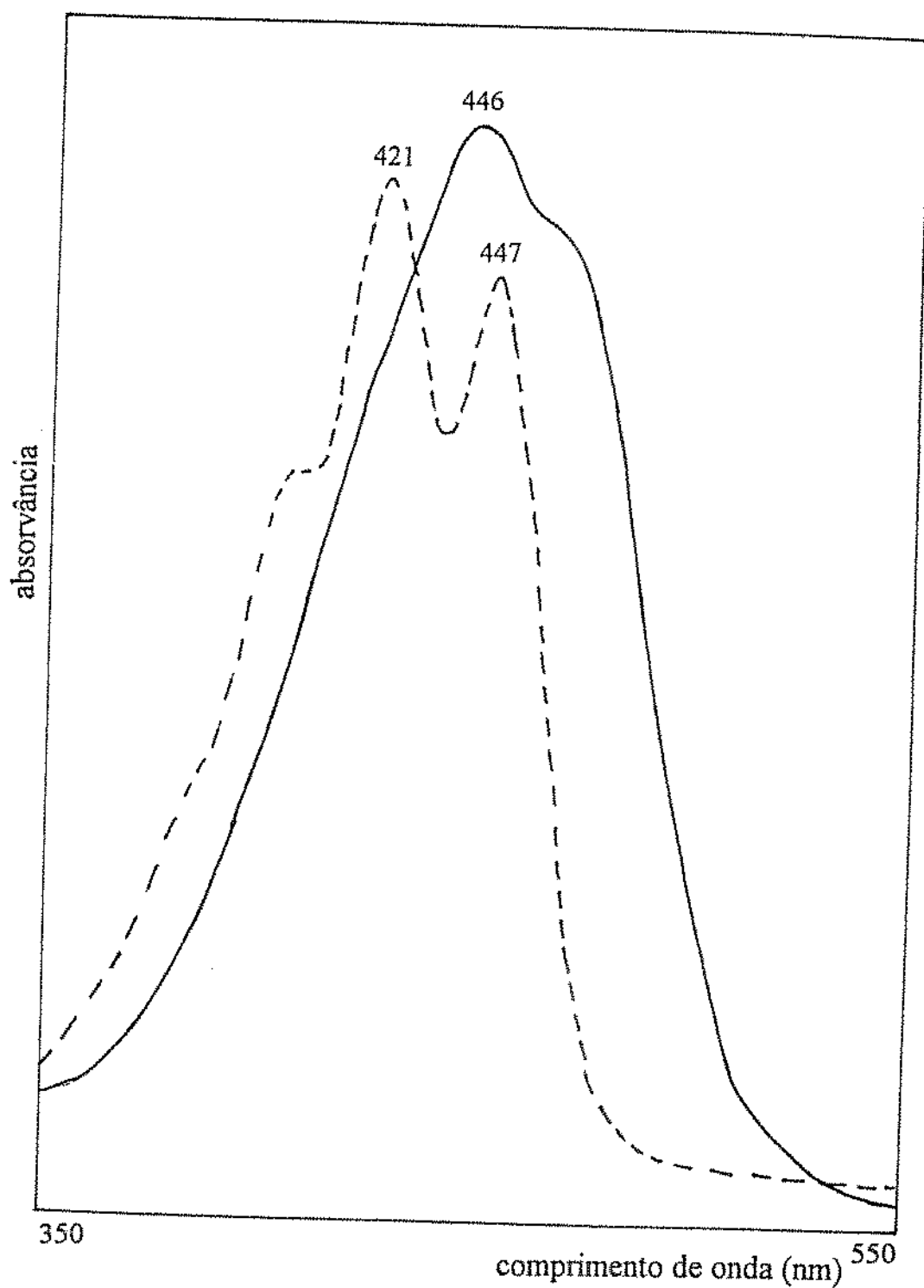


FIGURA 52: Espectros de absorção, obtidos em espectrofotômetro, em éter etílico, da β -citraurina antes (—) e após reação de redução (---).

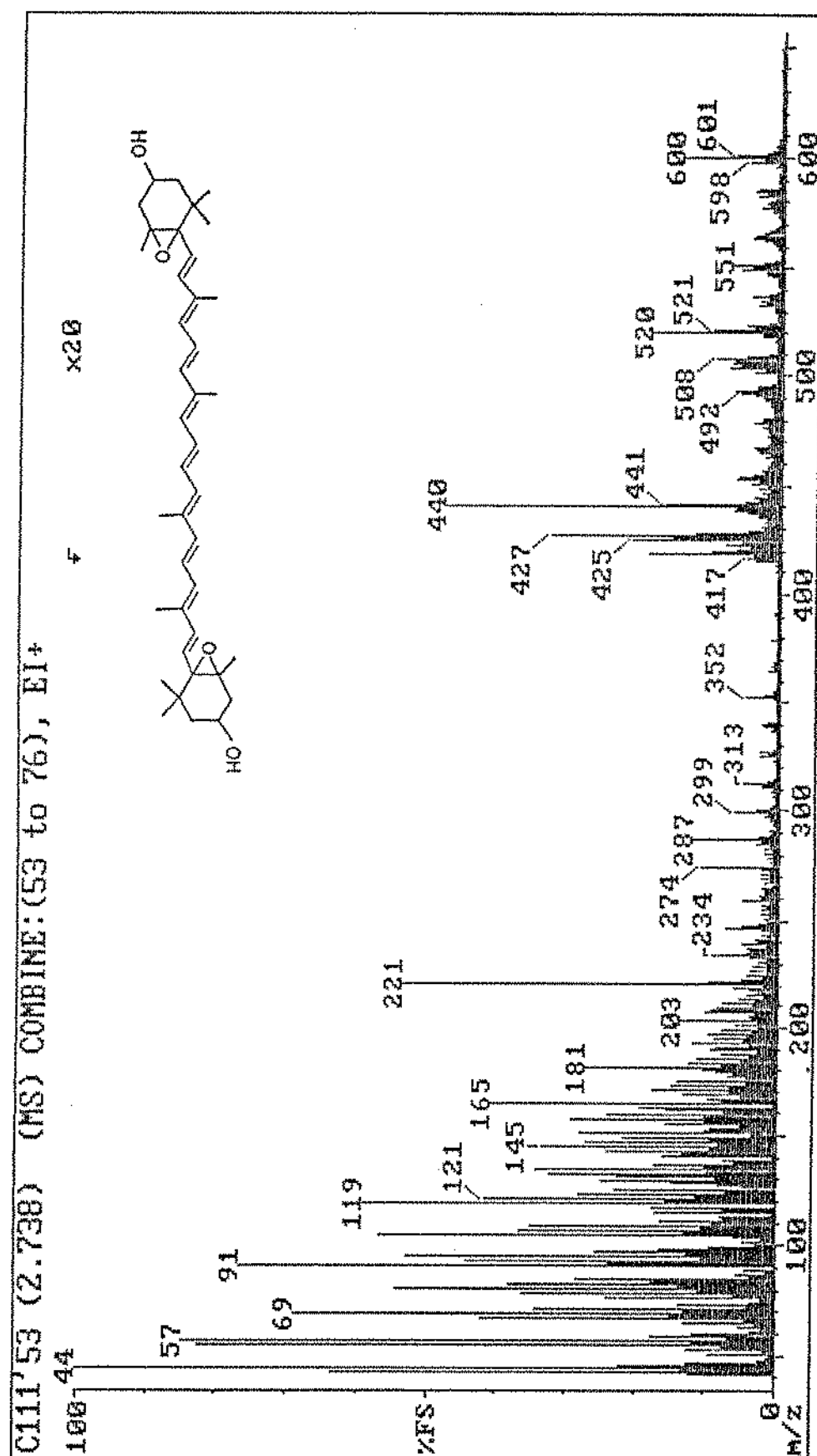


FIGURA 54: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da violaxantina, isolada de maracujá.

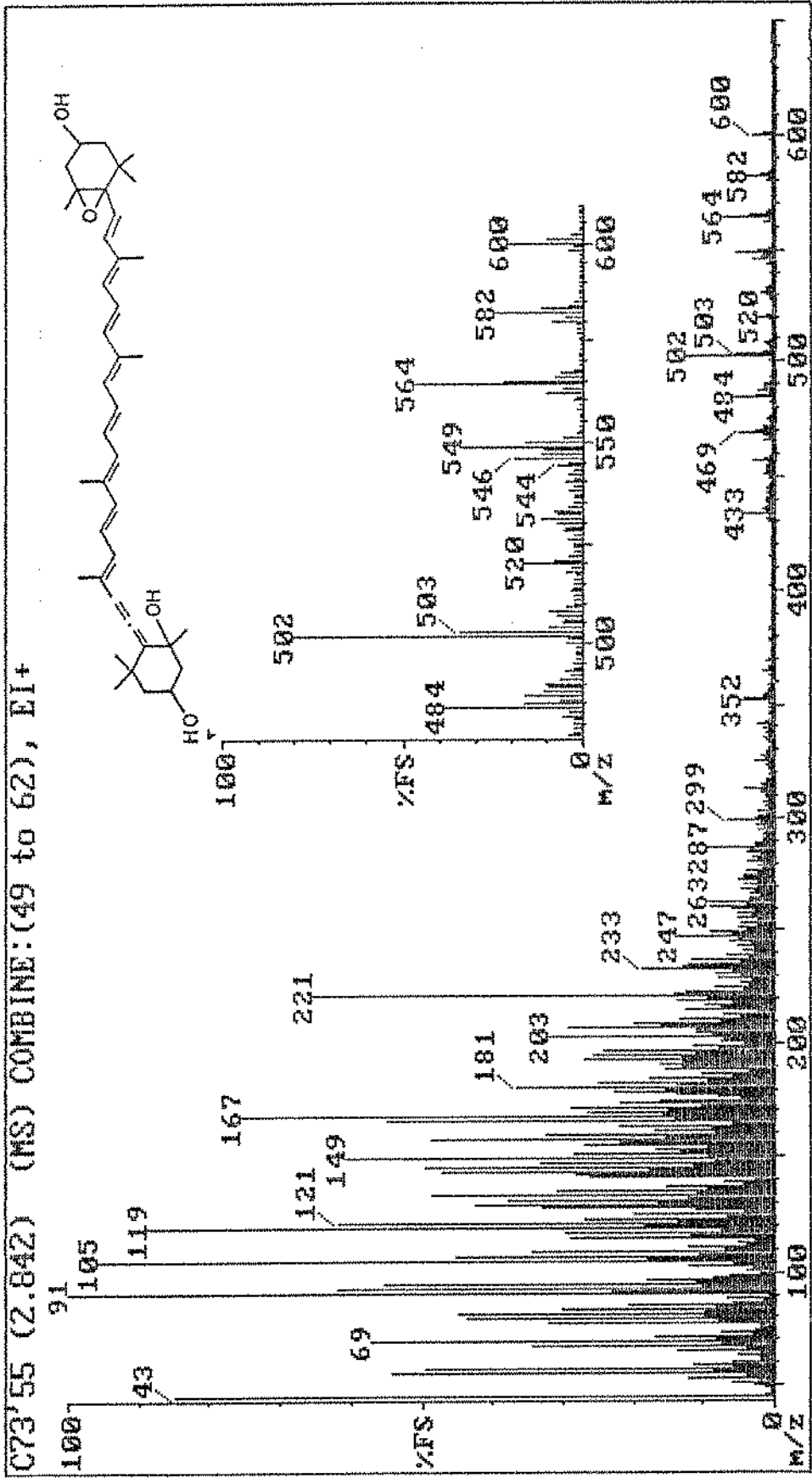


FIGURA 55: Espectro de massas de impacto de elétrons (70 eV) da neoxantina, isolada de maracujá.

LEUENBERGER & THOMMEN (citados por GROSS, 1987) e CECCHI (1978) detectaram auroxantina (5,8-diepóxido), enquanto que, neste trabalho foi detectado o correspondente 5,6-diepóxido (violaxantina), talvez devido ao cuidado de se utilizar placa de sílica básica para evitar o rearranjo do grupo 5,6-epóxido para 5,8-epóxido.

5.3.3. Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência

Apesar de terem sido testadas várias combinações de solventes com dois tipos de coluna (C_{18} e CN), nenhuma delas foi capaz de promover a separação dos carotenóides de maracujá. Diante deste fato, seguiu-se a estratégia de separar os carotenos em coluna de C_{18} e as xantofilas em coluna de CN.

A Figura 56 mostra o cromatograma do extrato de maracujá, em coluna de fase reversa, onde se obteve a melhor separação entre os carotenos, e os espectros de absorção na região visível fornecidos pelo DAD estão apresentados na Figura 57. Através da ordem de eluição na coluna e comparação dos espectros com valores da literatura, foi feita uma tentativa de identificação dos carotenos e das xantofilas monoidroxiladas. O pico 8 foi identificado como β -criptoxantina, o 9 como prolicopeno, o pico 11 como *cis*- ζ -caroteno, o 12 como ζ -caroteno, o pico 13 como fitoflueno+ β -caroteno e o 14 como fitoeno. O pico 10 apresentou uma mistura de, no mínimo, dois carotenos. Este fato evidencia a importância do uso do DAD, pois a forma simétrica do pico indicava, aparentemente, que era puro.

O mesmo extrato de maracujá foi separado em coluna de CN (polar). O cromatograma da Figura 58 mostra a complexidade desta amostra. Ao contrário da coluna de fase reversa, os carotenos (picos 1 a 5) foram eluídos rapidamente nesta coluna, e as xantofilas apresentaram-se melhor separadas. Os picos 7, 9, 11, 13 e 15 apresentaram espectros de absorção indicativos de serem misturas de, no mínimo, dois carotenóides (Figura 59). Os demais picos foram especulativamente identificados, considerando-se a ordem de eluição na coluna e o espectro de absorção (Figura 60), como sendo 5,8-epóxi- β -caroteno (pico 6), β -criptoxantina (pico 8), β -citraurina (pico 10), zeaxantina (pico 12), anteraxantina (pico 14), violaxantina (picos 16 e 17), neocromo (picos 18 e 19) e neoxantina (pico 20).

Estes resultados mostraram que a CLAE ainda não tem poder de resolução suficiente para separar todos os carotenóides em amostras complexas. Em nenhuma

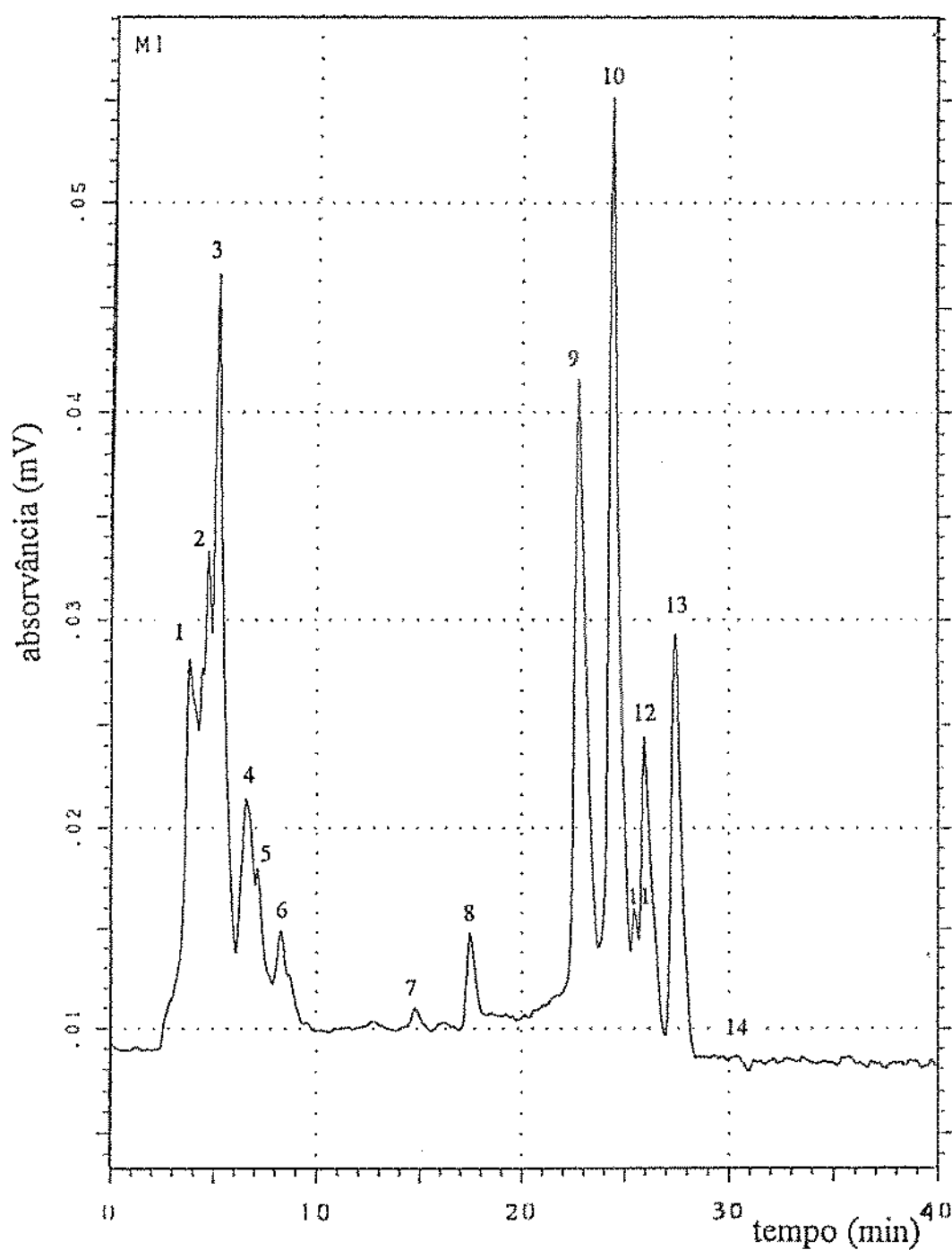


FIGURA 56: Cromatograma, obtido por CLAE com coluna de C₁₈, do extrato de maracujá. Fase móvel: gradiente de metanol-acetonitrila-diclorometano variando de 20:80:0 a 20:50:30 em 40 minutos. Os espectros de absorção encontram-se na Figura 57.

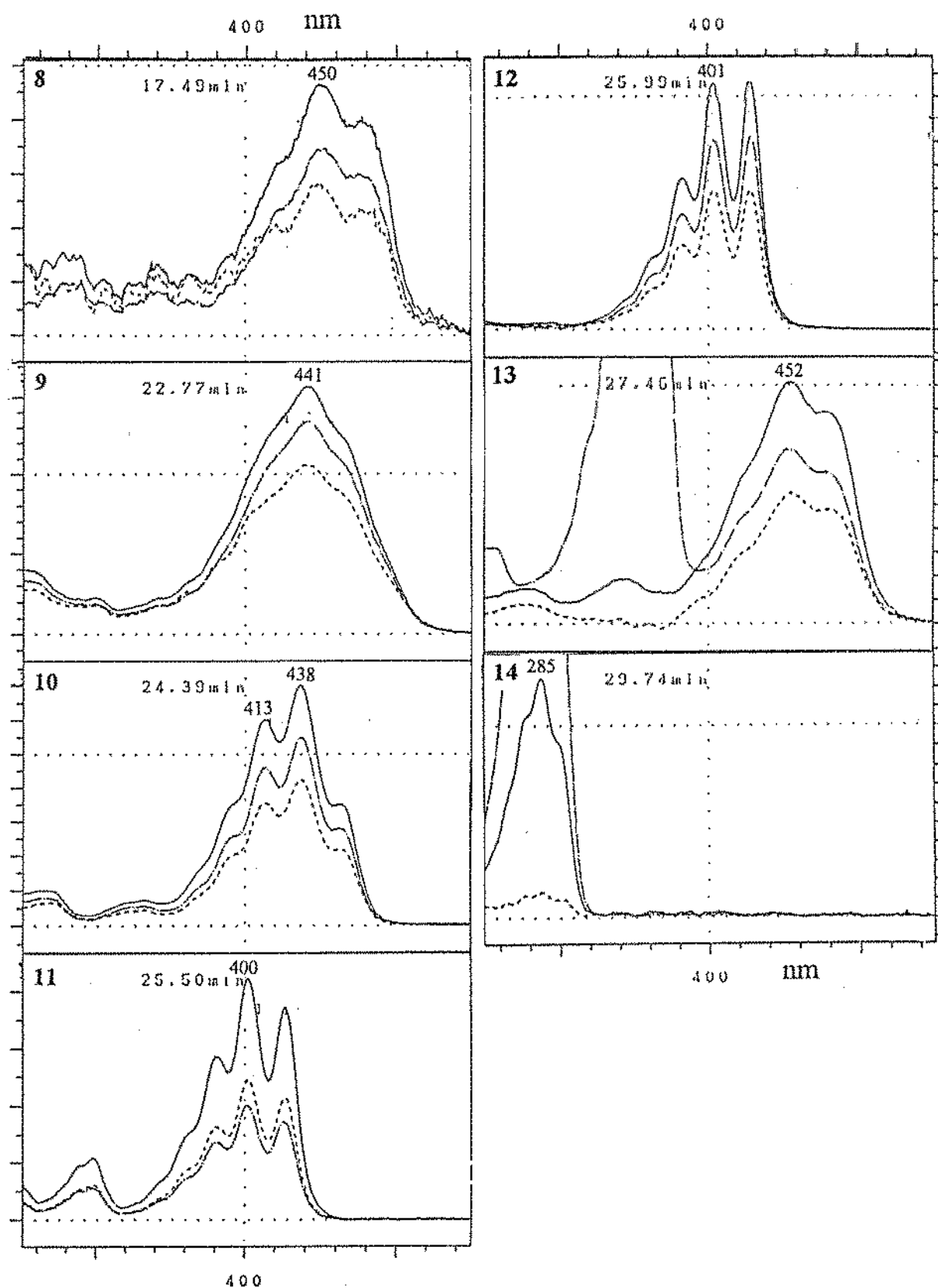


FIGURA 57: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 8: β -criptoxantina, 9: prolicopeno, 10: mistura, 11: *cis*- ζ -caroteno, 12: ζ -caroteno, 13: fitoflueno e β -caroteno, 14: fitoeno.

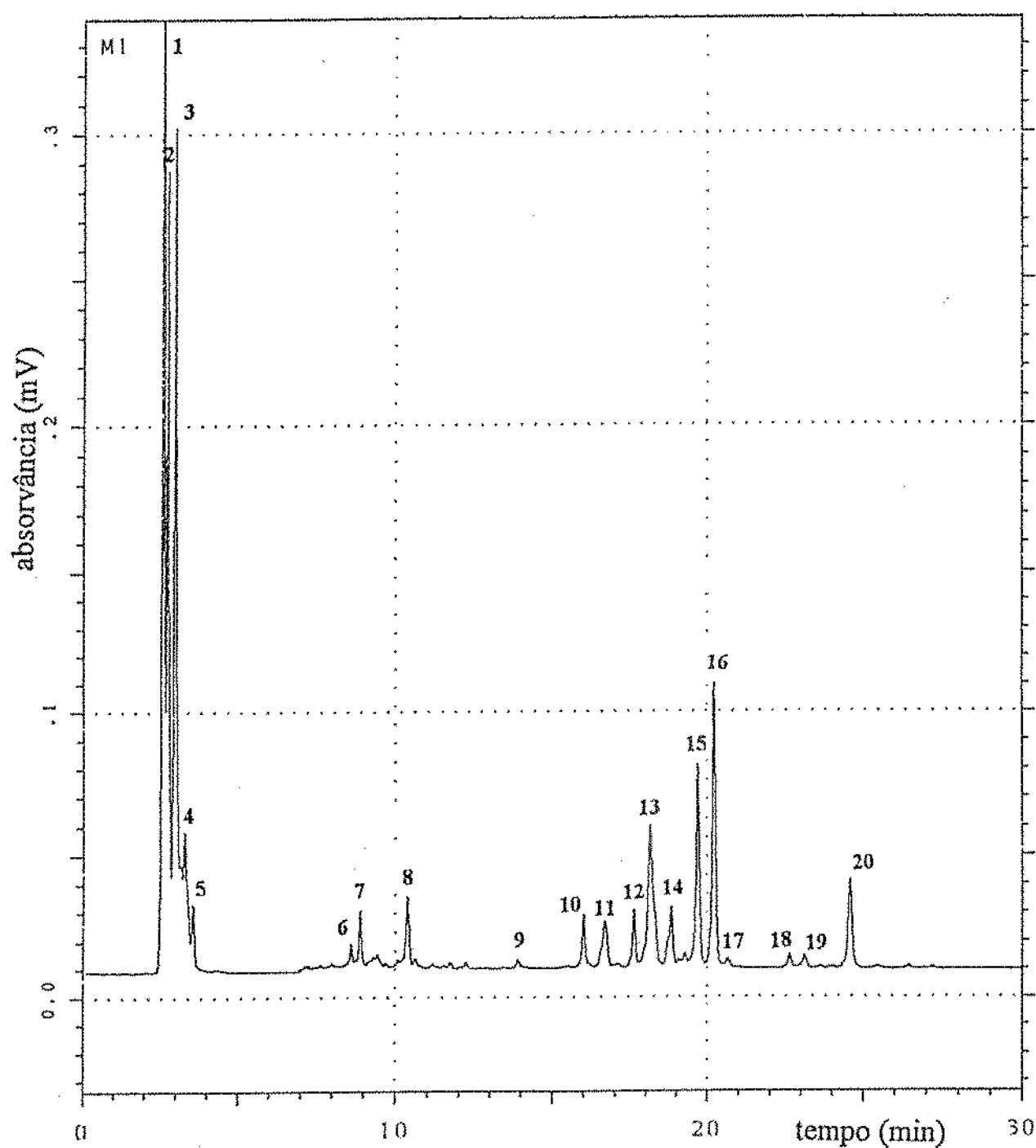


FIGURA 58: Cromatograma, obtido por CLAE com coluna de ciano, do extrato de maracujá. Fase móvel: gradiente de n-hexano-acetona variando de 100:0 a 60:40 em 30 minutos. Os espectros de absorção encontram-se nas Figuras 59 e 60.

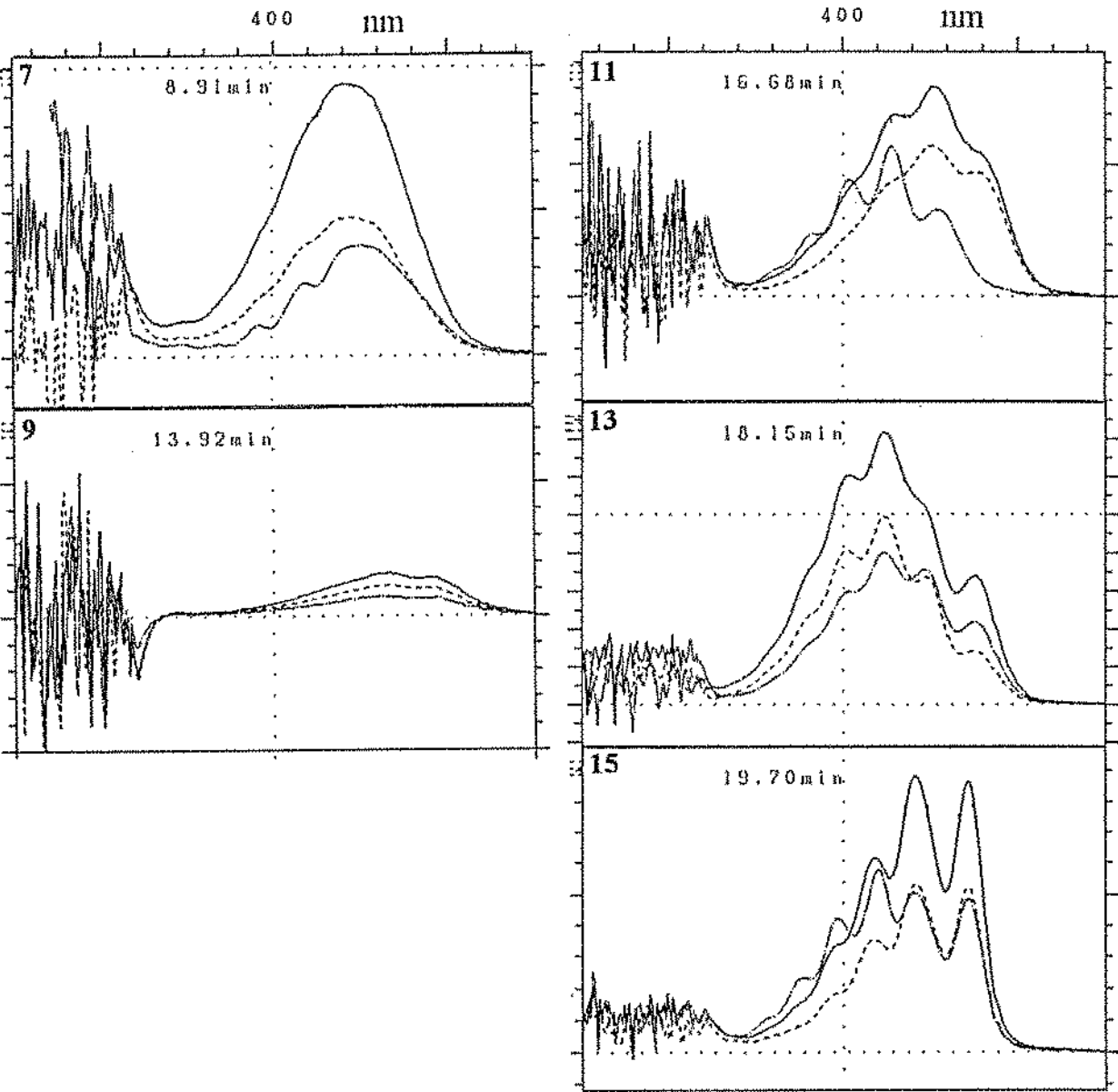


FIGURA 59: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 7, 9, 11, 13 e 15.

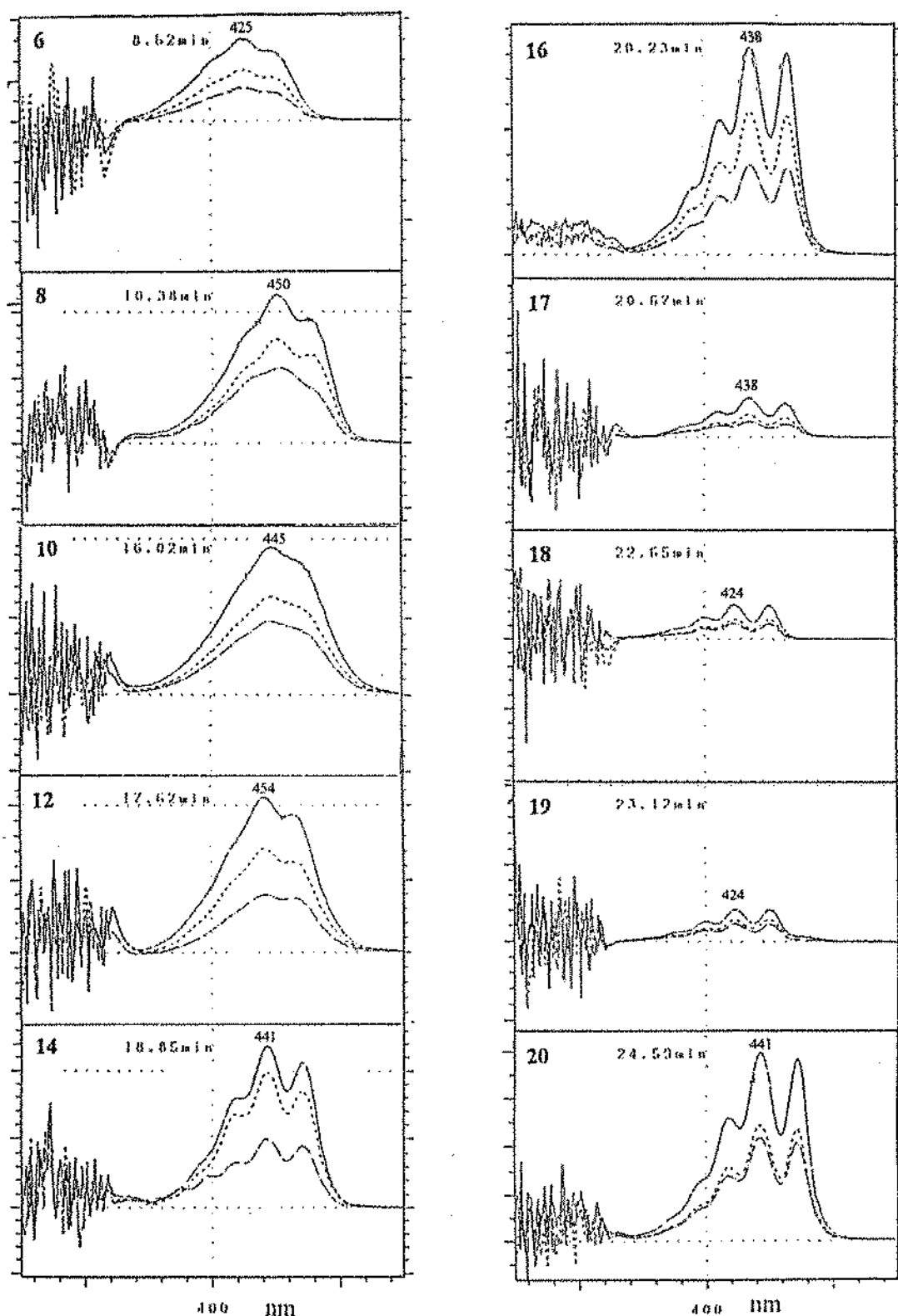


FIGURA 60: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, dos picos 6: 5,8-epóxi- β -caroteno, 8: β -criptoxantina, 10: β -citraurina, 12: zeaxantina, 14: anteraxantina, 16 e 17: violaxantina, 18 e 19: neocromo, 20: neoxantina.

das duas colunas, com diferentes características, houve separação satisfatória dos carotenóides, indicando que para tal separação seria necessário o emprego de colunas com maior eficiência ou de outra fase estacionária.

Na eventualidade de colunas mais eficientes serem conseguidas, a complexa composição do maracujá ainda mostra outra dificuldade na utilização de CLAE para a determinação de carotenóides. Dos 13 carotenóides confirmados em maracujá, somente o padrão de β -caroteno pode ser obtido comercialmente.

5.4. Carotenóides Minoritários Provitamínicos A em Verduras Folhosas Verdes

Segundo GOODWIN (1976), os tecidos de plantas verdes superiores possuem quatro carotenóides principais: β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Esta afirmação foi comprovada em numerosos trabalhos. Há discordância, no entanto, em torno dos carotenóides minoritários. Os pigmentos que são esporadicamente relatados, em pequenas quantidades, são: α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina e anteraxantina.

5.4.1. Incidência e confirmação da estrutura da α -criptoxantina

ROUCHAUD *et alii* (1985) e o grupo de RODRIGUEZ-AMAYA (RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA, 1987; MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1990, 1991) foram os únicos pesquisadores que encontraram α -criptoxantina ao invés de β -criptoxantina em folhas verdes. Nos trabalhos citados acima, a identificação foi baseada no espectro de absorção na região visível (λ_{max} e forma), nas propriedades cromatográficas e nos três últimos estudos, também na reação de metilação que indicou a posição alílica da hidroxila. Como existem três possíveis carotenóides monoidroxilados (Figura 61) e a β -criptoxantina foi o mais relatado, houve a necessidade de confirmação. Até o momento, na literatura internacional, ainda existe uma confusão sobre a natureza do carotenóide monoidroxilado, sendo que na maioria dos trabalhos foi escolhido um ou outro sem a devida comprovação.

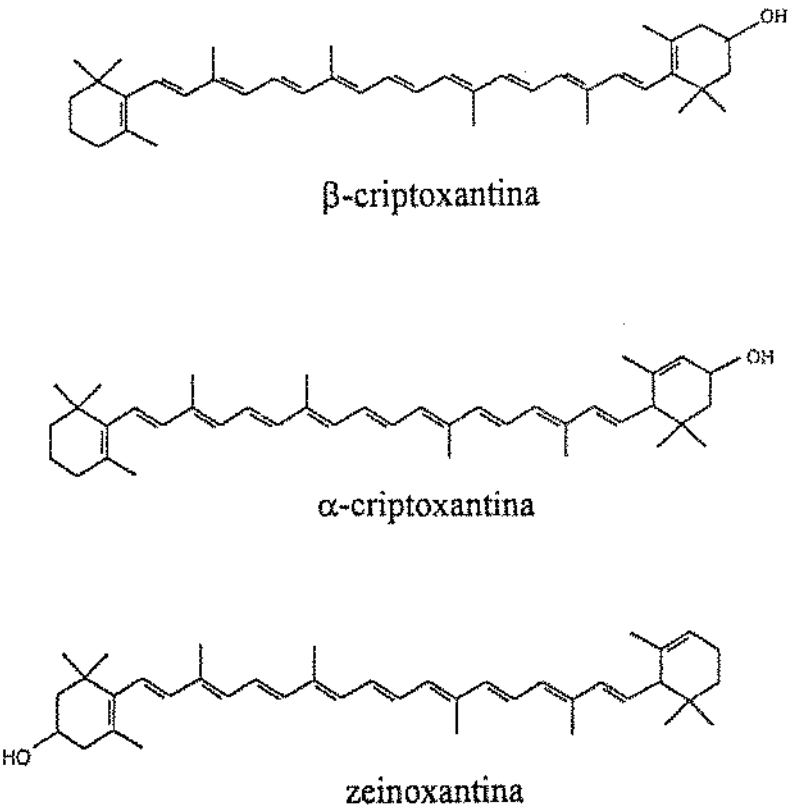


FIGURA 61: Estrutura dos carotenóides monoidroxilados: β -criptoxantina, α -criptoxantina e zeinoxantina.

Todas as verduras folhosas analisadas neste estudo apresentaram α -criptoxantina ao invés de β -criptoxantina. O espectro de absorção no visível, fornecido pelo DAD, foi idêntico ao do α -caroteno (Figura 62), fornecendo uma primeira identificação.

O espectro de massas (Figura 63) mostrou íon molecular de 552 u.m. e fragmento a m/e 534 ($M-H_2O$), correspondente à perda de uma hidroxila. A maior intensidade do pico de 534 u.m. em relação ao do íon molecular indicou que a hidroxila está em posição alílica, isto é, a razão $[M]^+/[M-18]^+$ é menor que 1,0. O valor encontrado para esta razão neste trabalho foi de 0,59. BRITTON & YOUNG (1993) também obtiveram valor abaixo de 1,0 para a razão acima para α -criptoxantina de tecidos fotossintéticos.

Esta é a primeira comprovação definitiva da presença de α -criptoxantina em plantas superiores. Até então, acreditava-se que o derivado monoidroxilado do α -caroteno era zeinoxantina em plantas superiores, e α -criptoxantina em alga vermelha (GROSS, 1987).

5.4.2. Incidência de α -caroteno

Das 11 verduras folhosas verdes analisadas neste estudo, a saber: alface crespa e lisa, caruru, couve, agrião, taioba, salsinha, rúcula, almeirão, chicória e espinafre, somente em 4 delas (caruru, couve, salsinha e taioba) foi encontrado α -caroteno (Tabela 17). A Figura 64 mostra um cromatograma de taioba, que apresentou α -criptoxantina e α -caroteno, e a Figura 65, o cromatograma obtido de rúcula, que não apresentou α -caroteno. Além do espectro obtido no DAD (Figura 62), foi realizada co-cromatografia com α -caroteno isolado de cenoura. Na Figura 66 encontra-se o cromatograma da taioba fortificada com α -caroteno.

Dos inúmeros trabalhos encontrados na literatura sobre composição de carotenóides em folhas, verifica-se que, para a mesma folha, há diferentes relatos quanto à presença de α -caroteno, mesmo entre aqueles que empregaram CLAE. A Tabela 18 mostra esses dados para quatro folhas, onde utilizou-se CLAE para a separação dos carotenóides. Dos sete estudos com espinafre, α -caroteno foi encontrado, em traços, em apenas em um deles. Em couve e salsinha não foi detectado α -caroteno. Entretanto, em alface, a situação é completamente dividida, já que três dos seis estudos apresentaram α -caroteno com teores variando de traços a 5,15 μ g/100g de amostra.

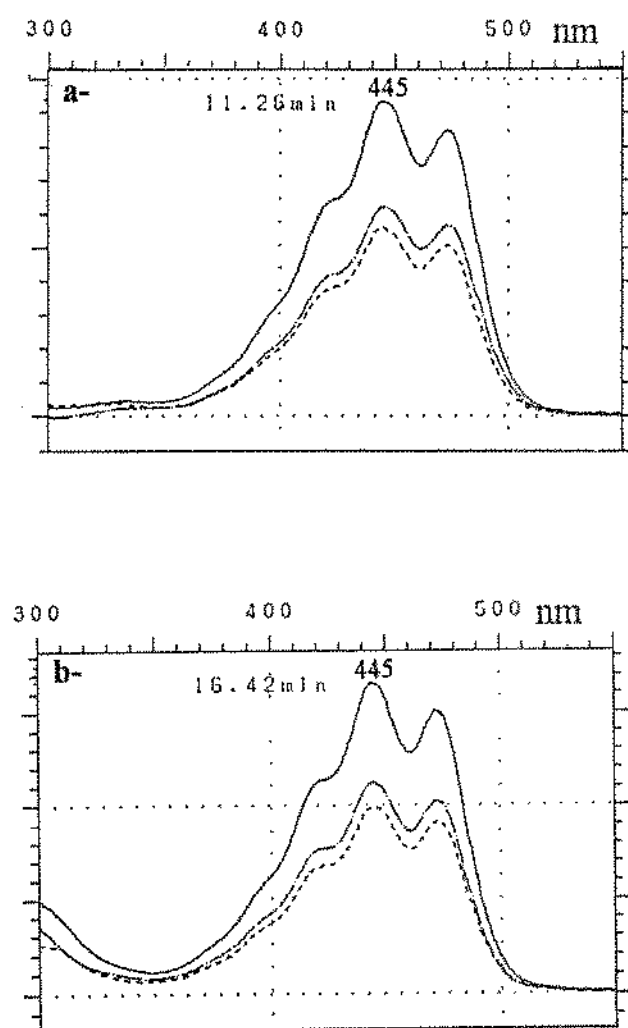


FIGURA 62: Espectros de absorção, obtidos pelo DAD, em metanol-água (98:2), da a- α -criptoxantina e do b- α -caroteno.

TABELA 17: Comprovação por CLAE da incidência de α -caroteno nas verduras folhosas brasileiras estudadas.

Folha	Nome Científico	α -caroteno
agrião	<i>Nastrutium officinale</i>	-
alface crespa	<i>Lactuca sativa</i>	-
alface lisa	<i>Lactuca sativa</i>	-
almeirão	<i>Chicorium intybus</i>	-
caruru	<i>Amaranthus viridis</i>	x
chicória	<i>Chicorium endivia</i>	-
couve	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	x
espinafre	<i>Spinacea oleracea</i>	-
rúcula	<i>Eruca sativa</i>	-
salsinha	<i>Petroselinum hortense</i>	x
taioba	<i>Xanthosoma spp.</i>	x

x: presença

-: ausência

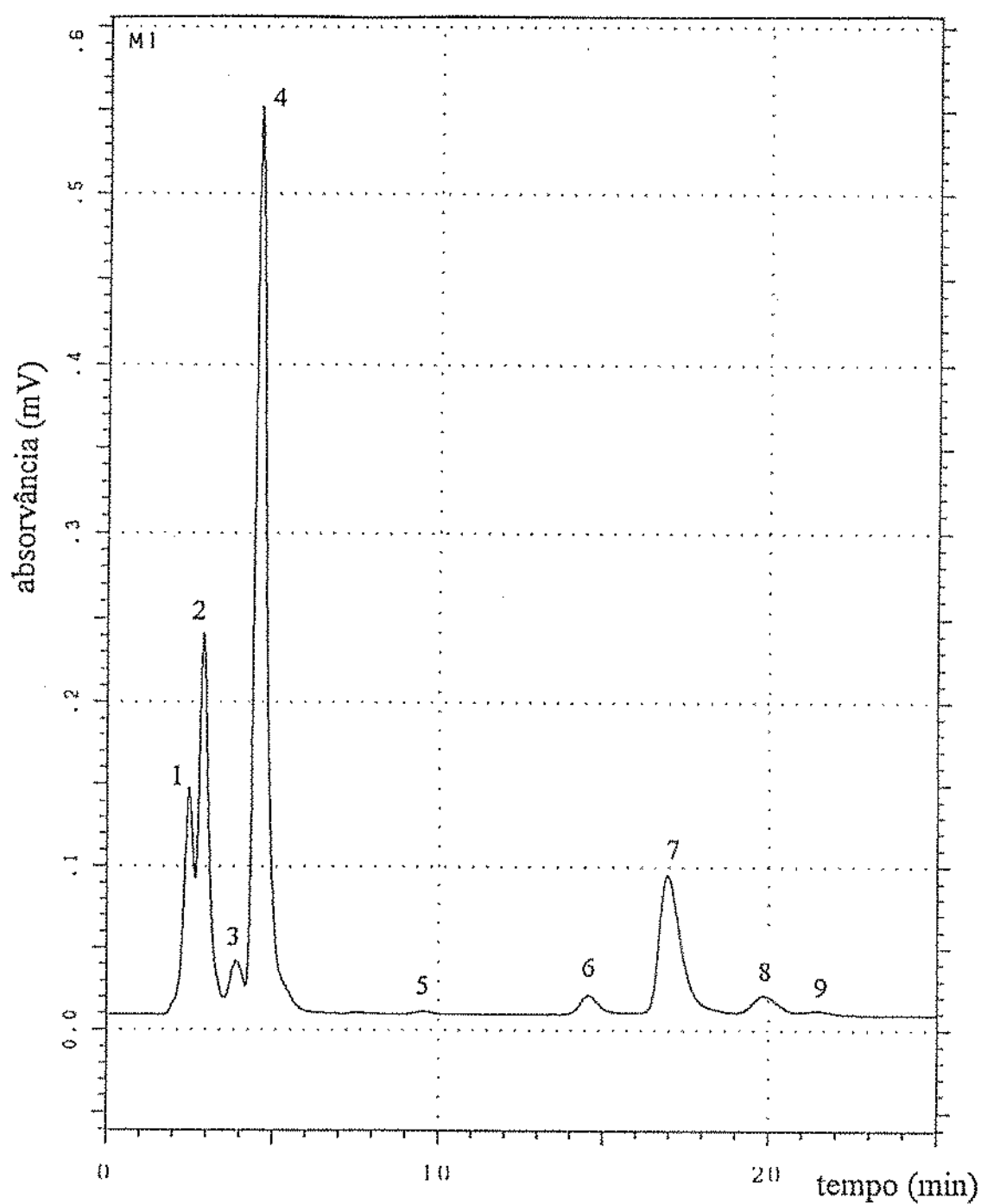


FIGURA 64: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de taioaba. Identificação dos picos: 1, 2, 3 e 4: poliidroxilados, 5: α -criptoxantina, 6: α -caroteno, 7: β -caroteno, 8 e 9: *cis* isômeros de β -caroteno. Condições cromatográficas: coluna C_{18} e como fase móvel MeOH- H_2O (98:2).

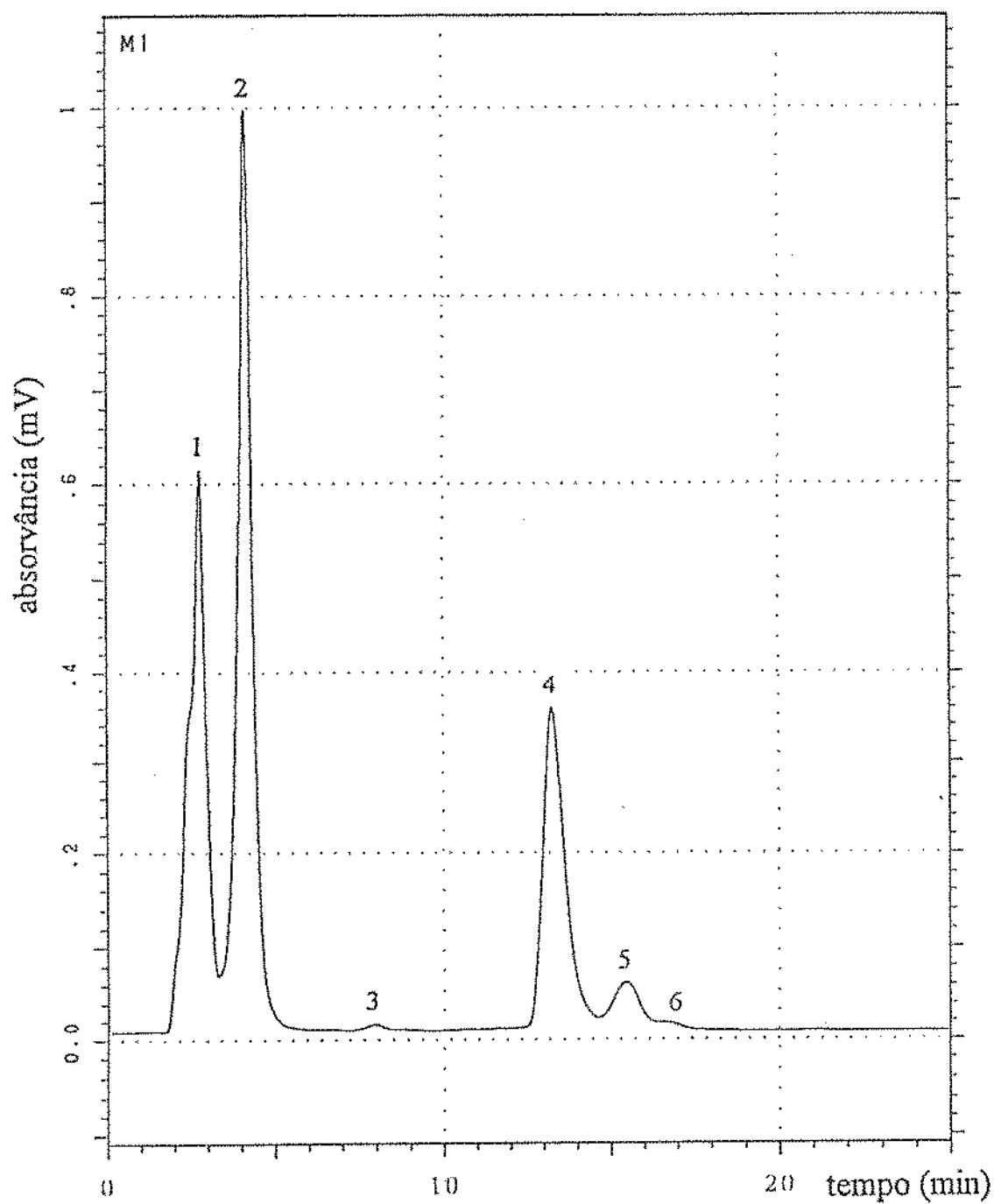


FIGURA 65: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de rúcula. Identificação dos picos: 1 e 2: poliidroxilados, 3: α -criptoxantina, 4: β -caroteno, 5 e 6: *cis* isômeros de β -caroteno. Condições cromatográficas: coluna C_{18} e como fase móvel MeOH- H_2O (98:2).

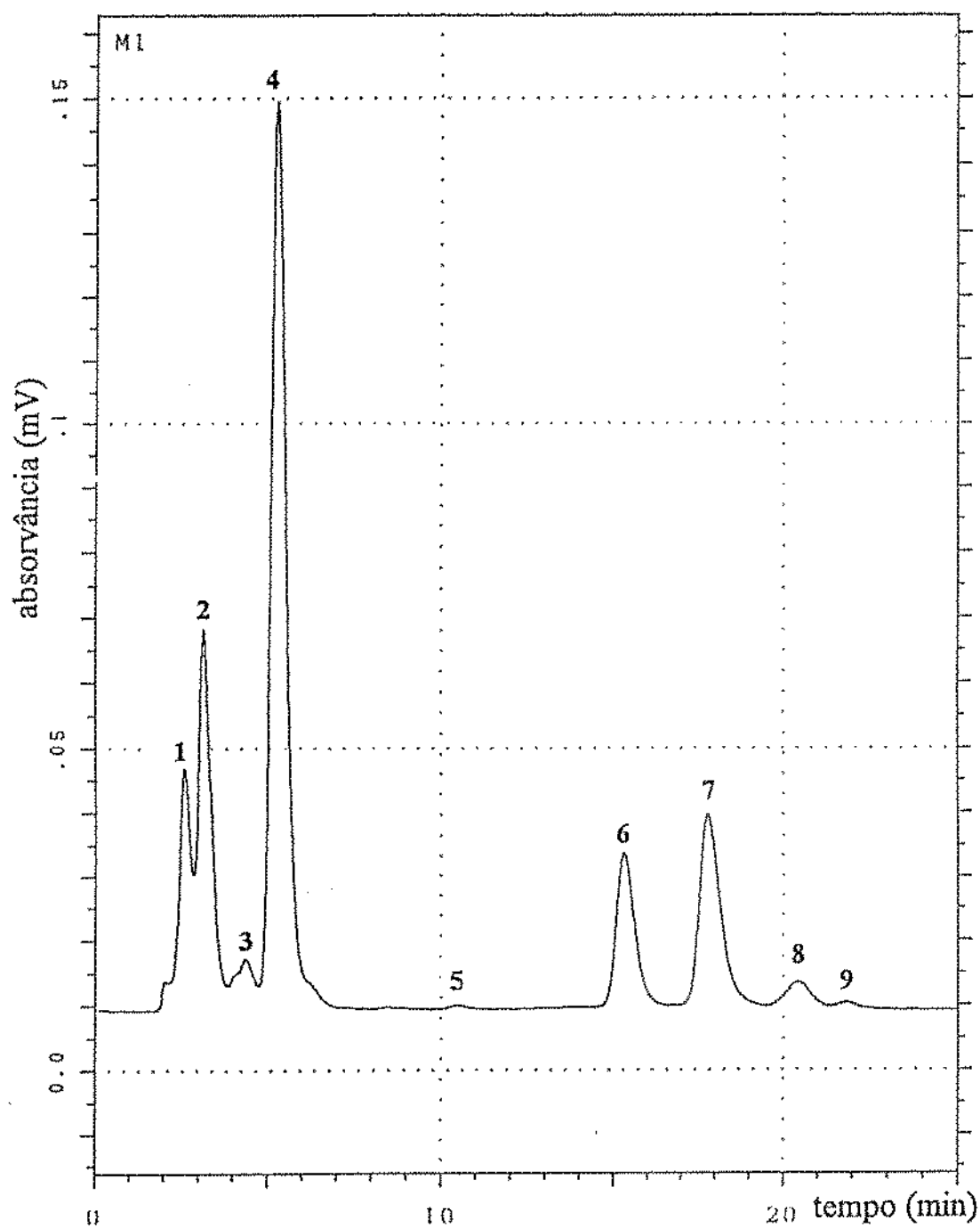


FIGURA 66: Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato de taioba fortificado com α -caroteno. Identificação dos picos: 1, 2, 3 e 4: poliidroxilados, 5: α -criptoxantina, 6: α -caroteno, 7: β -caroteno, 8 e 9: *cis* isômeros de β -caroteno. Condições cromatográficas: coluna C_{18} e como fase móvel MeOH- H_2O (98:2).

TABELA 18: Incidência de α -caroteno em 4 verduras folhosas reportada da literatura.

Folha	α -caroteno	Referência ^a
alface	x	BUREAU & BUSHWAY, 1986
	-	BUSHWAY, 1986
	x	HEINONEN <i>et alii</i> , 1989
	x	ABDEL-KADER, 1991
	-	TEE & LIM, 1991
	-	GRANADO <i>et alii</i> , 1992
espinafre	x	BRAUMANN & GRIMME, 1981
	-	BUREAU & BUSHWAY, 1986
	-	BUSHWAY, 1986
	-	KHACHIK <i>et alii</i> , 1986
	-	HEINONEN <i>et alii</i> , 1989
	-	ABDEL-KADER, 1991
	-	TEE & LIM, 1991
	-	GRANADO <i>et alii</i> , 1992
couve	-	KHACHIK <i>et alii</i> , 1986
	-	CARVALHO <i>et alii</i> , 1992
salsinha	-	HEINONEN <i>et alii</i> , 1989
	-	YAMAUCHI & WATADA, 1993

^aForam relacionados somente os trabalhos que utilizaram CLAE.

x: presença

-: ausência.

Como o α -caroteno estava presente em pequenas quantidades, quando detectado, esta disparidade nos resultados pode ser explicada pelos diferentes níveis de detecção dos métodos e/ou pelo comprovado efeito das diferentes espécies e cultivares, do clima e do solo sobre o teor de carotenóides e presença dos minoritários em folhas (MERCADANTE & RODRIGUEZ-AMAYA, 1991). Os resultados obtidos indicam ser a segunda explicação a mais provável, já que as condições analíticas empregadas no presente trabalho foram as mesmas para as 11 folhas estudadas.

6. CONCLUSÕES

1. Com o uso conjunto de informações provenientes da CLAE-DAD (tempo de retenção, co-cromatografia e espectro no visível) e reações químicas específicas, foram identificados os seguintes carotenóides em mangas cv. Keitt e Tommy Atkins: *trans*- β -caroteno, *cis* e *trans*- β -criptoxantina, *trans*-zeaxantina, isômeros de luteoxantina, 9-*cis*-, 13-*cis*- e *trans*-violaxantina, e *cis*- e *trans*-neoxantina.
2. Os mesmos carotenóides e, adicionalmente, luteína e monoepóxi- β -caroteno tiveram suas identidades confirmadas (não a forma geométrica) por espectrometria de massas. Portanto, o uso correto dos parâmetros clássicos de identificação (sem espectrometria de massas) pode ser considerado conclusivo na identificação dos carotenóides comuns.
3. O rearranjo epóxido-furanóxido do extrato total de manga, monitorado por CLAE, se mostrou muito útil na confirmação do epóxido 5,6, resultando em mudanças nítidas do tempo de retenção e λ_{max} . A verificação da configuração geométrica através da reação de isomerização, monitorada por CLAE, só foi possível para os carotenóides majoritários, quando a coluna separou suas formas isoméricas, ou o carotenóide encontrava-se numa única forma geométrica.
4. Não houve diferença significativa, a nível de 1%, entre os teores de β -caroteno e a 5% entre os teores de violaxantina obtidos por CLAE e por cromatografia líquida clássica. A cromatografia líquida clássica demonstrou ser mais precisa que a CLAE, embora somente esta última técnica tenha proporcionado a separação dos epóxidos di- e triidroxilados.
5. O principal carotenóide encontrado nas mangas cv. Tommy Atkins e Keitt foi *trans*-violaxantina, seguido de 9-*cis*-violaxantina e β -caroteno.
6. *trans*-Violaxantina, 9-*cis*-violaxantina, neoxantina e *cis*-neoxantina tenderam a teores maiores na cv. Tommy Atkins. Por outro lado, a zeaxantina apresentou concentração maior na cv. Keitt.

7. O teor de β -caroteno foi duas vezes maior na manga Keitt procedente da Bahia, Estado com clima mais quente, do que na de São Paulo. *Trans*-violaxantina e 9-*cis*-violaxantina também apresentaram maiores níveis nas mangas da Bahia, aproximando-se dos níveis encontrados na cv. Tommy Atkins de São Paulo. Efeitos climáticos podem, portanto, superar as diferenças entre cultivares.
8. Durante o amadurecimento das mangas Keitt e Tommy Atkins, os teores de β -caroteno e *trans*-violaxantina praticamente triplicaram, 9-*cis*-violaxantina quadruplicou e a pequena quantidade de 13-*cis*-violaxantina desapareceu ou ficou reduzida a traços. Em termos de porcentagem, pequenas transformações foram notadas, sendo as mudanças mais pronunciadas as diminuições da neoxantina e da 13-*cis*-violaxantina.
9. Foram identificados em maracujá, através de espectros de absorção e de massas e reações químicas específicas, os seguintes carotenóides: fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -caroteno, licopeno, prolicopeno, monoepóxi- β -caroteno, β -criptoxantina, β -citraurina, anteraxantina, violaxantina e neoxantina.
10. As colunas de CLAE, C_{18} e ciano, com várias combinações de solventes como fase móvel, não se mostraram eficientes para separar os carotenóides do maracujá.
11. A identidade do carotenóide monoidroxilado, encontrado em verduras folhosas brasileiras, foi confirmada por EM como sendo α -criptoxantina.
12. Ao contrário do α -caroteno, presente em apenas quatro das verduras folhosas analisadas, a α -criptoxantina foi encontrada, em pequenas quantidades, em todas as onze verduras folhosas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KADER, Z.M. Determination of carotenoids in foods by high-performance liquid chromatography. *Die Nahrung* **35** (7): 689-693, 1991.
- ALMELA, L.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; CANDELA, M.E. & ALCÁZAR, M.D. Separation and determination of individual carotenoids in a Capsicum cultivar by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **502**: 95-106, 1990.
- ALMELA, L.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; CANDELA, M.E. & ALCÁZAR, M.D. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1606-1609, 1991.
- BARANYAI, M.; MATUS, Z. & SZABOLCS, J. Determination, by HPLC, of carotenoids in paprika products. *Acta Aliment.* **11**: 309-323, 1982.
- BEN-AZIZ, A., BRITTON, G. & GOODWIN, T.W. Carotene epoxides of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochem.* **12**: 2759-2764, 1973.
- BENDICH, A. Carotenoids and the Immune System. In: "Carotenoids, Chemistry and Biology". N.I. Krinsky, M.M. Mathews-Roth (Eds.). Plenum Press, New York, 1989. p. 323-336.
- BENDICH, A. Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* **66** (5): 1017-1024, 1994.
- BLACS, P.A.; DAOOD, H.G.; PAVISA, A. & HAJDU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L. var. Sz-20). *J. Agric. Food Chem.* **37**: 350-353, 1989.
- BIEMANN, K. Mass Spectrometry. In "Organic Chemical Applications". Mc Graw Hill, New York, 1962. p. 170-173.
- BRAUMANN, T. & GRIMME, L.H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* **637**: 8-17, 1981.
- BRITTON, G. General carotenoid methods. *Methods in Enzymol.* **111** (B): 113-119, 1985.
- BRITTON, G. & GOODWIN, T.W. Carotene epoxides from the Delta tomato mutant. *Phytochem.* **14**: 2530-2532, 1975.

- BRITTON, G. & GOODWIN, T.W. The occurrence of phytoene-1,2-oxide and related carotenoids in tomatoes. *Phytochem.* 8: 2257-2258, 1969.
- BRITTON, G. & YOUNG, A.J. Methods for the Isolation and Analysis of Carotenoids. In: "Carotenoids in Photosynthesis". A. Young and G. Britton (Eds.). 1st ed. Chapman & Hall, London, 1993. p. 409-457.
- BUCHECKER, R.; LIAAEN-JENSEN, S. & EUGSTER, C.H. The identity of trolloxanthin and trolliflor with neoxanthin. *Phytochem.* 14: 797-799, 1975.
- BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food Sci.* 51 (1): 128-130, 1986.
- BUSHWAY, R.J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 8 (8): 1527-1547, 1985.
- BUSHWAY, R.J. Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 409-412, 1986.
- BUSHWAY, R.J. & WILSON, A.M. Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by HPLC. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15(3): 165-169, 1982.
- CANO, M.P. HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1786-1791, 1991.
- 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.
- CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.H. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 33 (3/4): 133-137, 1992.
- CECCHI, H. Pigmentos, vitamina A e outras propriedades físicas, químicas e sensoriais de sucos de cajú e maracujá. Tese de Mestrado. UNICAMP, 1978.
- CHANDLER, L.A. & SCHWARTZ, S.J. HPLC separation of *cis* - *trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 52 (3): 669-672, 1987.
- CHANDLER, L.A. & SCHWARTZ, S.J. Isomerization and losses of *trans*- β -carotene in sweet potatoes, as affected by processing treatments. *J. Agric. Food Chem.* 36: 129-133, 1988.

- CHAUDHARY, M.T. Carotenoid pigments of different varieties of mangoes, changes during ripening. *J. Sci. Food Agric.* 1: 173-177, 1950.
- COLDITZ, G.A.; BRANCH, L.G.; LIPNICK, R.J.; WILLET, W.C.; ROSNNER, B.; POSNER, B.M. & HENNEKENS, C.H. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. *J. Am. Clin. Nutr.* 41: 32-36, 1985.
- CRAFT, N.E.; SANDER, L.C. & PIERSON, H.F. Separation and relative distribution of all-*trans*- β -carotene and its *cis* isomers in β -carotene preparations. *J. Micronutr. Anal.* 8: 209-221, 1990.
- CURL, A.L. The carotenoids of cling peaches. *Food Res.* 24 (4): 413-421, 1959.
- CURL, A.L. The carotenoids of apricots. *Food Res.* 25 (2): 190-196, 1960.
- CURL, A.L. The carotenoids of tomatoes. *J. Food Sci.* 26: 106-110, 1961.
- CURL, A.L. The carotenoids of red bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* 10 (6): 504-509, 1962.
- CURL, A.L. The carotenoids of several low-carotenoid fruits. *J. Food Sci.* 29 (3): 241-245, 1964.
- CURL, A.L. & BAILEY, G.F. Polyoxygen carotenoids of valencia orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 13 (2): 685-690, 1954.
- CURL, A.L. & BAILEY, G.F. Part I. Comparison of carotenoids of valencia orange peel and pulp. *J. Agric. Food Chem.* 4 (2): 156-159, 1956.
- CURL, A.L. & BAILEY, G.F. The carotenoids of tangerines. *J. Agric. Food Chem.* 5 (8): 605-608, 1957.
- DAOOD, H.G.; BIACS, P.A.; HOSCHKE, A.; HARKEY-VINKLER, M. & HAJDU, F. Separation and identification of tomato fruit pigments by TLC and HPLC. *Acta Alimentaria* 16 (4): 339-350, 1987.
- DAOOD, H.G.; CZINKOTAI, B.; HOSCHKE, A. & BIACS, P.A. High-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables. *J. Chromatogr.* 472: 296-302, 1989.
- DAVIES, B.H. Carotenoids. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". T.W. Goodwin (Ed.), vol 2. Academic Press, London. 1976. p. 38-165.
- DEGNAN, A.J.; ELBE, J.H. & HARTEL, R.W. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.* 56: 1655-1659, 1991.

- DELI, J.; MATUS, Z. & SZABOLCS, J. Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annum* variety *longum nigrum*) during ripening. **J. Agric. Food Chem.** 40: 2072-2076, 1992.
- ENZELL, C.R. Mass spectrometric studies of carotenoids. **Pure & Appl. Chem.** 20: 497-515, 1969.
- ENZELL, C.R.; FRANCIS, G.W. & LIAAEN-JENSEN, S. Mass spectrometric studies of carotenoids. 1. Occurrence and intensity ratios of M-92 and M-106 peaks. **Acta Chem. Scand.** 22 (3): 1054-1055, 1968.
- ENZELL, C.R.; FRANCIS, G.W. & LIAAEN-JENSEN, S. Mass spectrometric studies of carotenoids. 2. Survey of fragmentation reactions. **Acta Chem. Scand.** 3: 727-750, 1969.
- ENZELL, C.R. & BROMAN, S. Mass Spectrometry. In: "Analysis of Carotenoids". G. Britton, H. Pfander and S. Liaaen-Jensen (Eds.). Academic Press, London. 1994.(no prelo).
- ESKINS, K.; SCHOLFIELD, C.R. & DUTTON, H.J. High-performance liquid chromatography of plant pigments. **J. Chromatogr.** 135: 217-220, 1977.
- EUGSTER, C.H. Chemical Derivatization: Microscale Tests for the Presence of Common Functional Groups in Carotenoids. In: "Analysis of Carotenoids". G. Britton, H. Pfander and S. Liaaen-Jensen (Eds.). Academic Press, London. 1994. (no prelo).
- FARIN, D., IKAN, R. & GROSS, J. The carotenoid pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata*) cv. Michal during ripening. **Phytochem.** 22 (2): 403-408, 1983.
- FISHER, C. & KOCIS, J.A. Separation of paprika pigments by HPLC. **J. Agric. Food Chem.** 35 (1): 55-57, 1987.
- FRANCIS, G.W. Factors affecting the intensity ratio of M-92/M-106 ions in the mass spectra of carotenoids. **Acta Chem. Scand.** 26 (4): 1443-1453, 1972.
- FRECKNALL, E.A. & PATTENDEN, G. Carotenoid differences in isogenic lines of tomato fruit colour mutants. **Phytochem.** 23 (8): 1707-1710, 1984.
- GERSTER, H. Potential role of β -carotene in prevention of cardiovascular disease. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.** 61: 277, 1991.
- GILLAN, F.T. & JONHS, R.B. Normal-phase HPLC analysis of microbial carotenoids and neutral lipids. **J. Chromatogr. Sci.** 21: 34-38, 1983.

- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and pureé. *Intern. J. Food Technol.* 22: 451-460, 1987.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of commercial mangoes from Brazil. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 22: 100-103, 1989.
- GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *J. Agric. Food Chem.* 42 (6): 1306-1313, 1994.
- GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; CONNOR, A.E. & BRITTON, G. Confirmation of the structure of papaya β -cryptoxanthin monoepoxide. *Food Chem.* 36: 281-286, 1990.
- GOODWIN, T. W. Distribution of Carotenoids. In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". 2nd ed. T.W. Goodwin(Ed.). Academic Press, London, 1976. p 225-257.
- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. & ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2135-2140, 1992.
- GREGORY, G.K.; CHEN, T.S. & PHILIP, T. Quantitative analysis of carotenoids and carotenoids esters in fruits by HPLC: red bell peppers. *J. Food Sci.* 52 (4): 1071 - 1073, 1987.
- GROSS, J. Pigments in Fruits. Academic Press, London, 1987. p. 87-258.
- GROSS, J., CARMON, M., LIFSHITZ, A. & SKLARZ, B. Structural elucidation of some orange juice carotenoids. *Phytochem.* 14: 249-252, 1975.
- GROSS, J. & ECKHARDT, G. A natural apocarotenol from the peel of the ripe Golden delicious apple. *Phytochem.* 17: 1803-1804, 1978.
- GROSS, J. & ECKHARDT, G. Structures of persicaxanthin, persicachrome and other apocarotenols of various fruits. *Phytochem.* 20 (9): 2267-2269, 1981.
- GROSS, J., GABAI, M. & LIFSHITZ, A. Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. *Phytochem.* 12: 2259-2263, 1973a.
- GROSS, J., GABAI, M. & LIFSHITZ, A. Carotenoids of *Eriobotrya japonica*. *Phytochem.* 12: 1775-1782, 1973b.

- GROSS, J., GABAI, M. & LIFSHITZ, A. Structures of some carotenoids from the pulp of *Persea americana*. *Phytochem.* 13: 1917-1921, 1974.
- GROSS, J., IKAN, R. & ECKHARDT, G. Carotenoids of the fruit of *Averrhoa carambola*. *Phytochem.* 22 (6): 1479-1481, 1983.
- HEINONEN, M.I.; OLLIAINEN, V.; LINKOLA, E.K.; VARO, P.T. & KOIVISTOINEN, P.E. Carotenoids in Finish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37: 655-659, 1989.
- HOMNAVA, A.; PAYNE, J.; KOEHLER, P. & EITENMILLER, R. Provitamin A (alpha-carotene, beta-carotene and beta-cryptoxanthin) and ascorbic acid content of Japanese and American persimmons. *J. Food Quality* 13: 85-95, 1990.
- HSIEH, Y.P.C. & KAREL, M. Rapid extraction and determination of α - and β -carotene in foods. *J. Chromatogr.* 259: 515-518, 1983.
- IBGE. Anuário Estatístico do Brasil. v. 51, Rio de Janeiro, 1991. p. 501-529.
- IRIYAMA, K., YOSHIURA, M. & SHIRAKI, M. Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using HPLC. *J. Chromatogr.* 154: 302-305, 1978.
- ISAKEN, M. & FRANCIS, G.W. Preparative HPLC of carotenoids. *Chromatographia* 27: 325-327, 1989.
- JAVOR, T.; BATA, M.; LAVASZ, L.; MORAN, F.; NAGY, L.; PATTY, I.; SZABOKS, J.; TARNOK, F.; TOTH, G. & MOZSIK, G. Gastric cytoprotective effects of vitamin A and other carotenoids. *Int. J. Tissue React.* 5: 289-296, 1983.
- JOHN, J.; SUBBARAYAN, C. & CAMA, H.R. Carotenoids in three stages of ripening of mango. *J. Food Sci.* 35: 262, 1970.
- JUNGALWALA, F.B. & CAMA, H.R. Carotenoids in mango (*Mangifera indica*) fruit. *Indian J. Chem.* 1: 36, 1963.
- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Decapreno- β -carotene as an internal standard for the quantification of the hydrocarbon carotenoids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 346: 237-246, 1985.
- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Application of a C₄₅- β -carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 35: 732-738, 1987.

- KHACHIK, F. & BEECHER, G.R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid 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. & LUSKY, W.R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. 2. Isolation and characterization of carotenoids and related esters. *J. Agric. Food Chem.* 36: 938-946, 1988.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G.R. & LUSKY, W.R. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1465-1473, 1989.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G.R. & LUSKY, W.R. Application of an HPLC-photodiode array detector-mass spectrometry in human metabolic studies with carotenoids. In "X International Symposium on Carotenoids". Trondheim, Noruega, 1993. CL5-2.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G.R. & WHITTAKER, 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 (4): 603-616, 1986.
- KHACHIK, F.; GOLI, M.B.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W.R., TENORIO, M.D. & BARRERA, M.R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 390-398, 1992.
- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & GODOY, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. *Food Chem.* 35: 187-195, 1990.
- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & YOKOYAMA, S. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 24: 415-418, 1991.
- KJØSEN, H. & LIAAEN-JENSEN, S. Major carotenoids of *Shepherdia canadensis*. Isolation and synthesis of methyl apo-6'-lycopenoate. *Phytochem.* 8: 483-491, 1969.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* 66 (5): 1003-1010, 1994.

- LEUENBERGER, U. & STEWART, I. β -Citraurinene, a new C_{30} - citrus carotenoid. *Phytochem.* 15: 227-229, 1976.
- MARKHAM, M.C. & LIAAEN-JENSEN, S. Carotenoids of higher plants- I. The structures of lycoxanthin and lycophyll. *Phytochem.* 7: 839-844, 1968.
- MATHEWS-ROTH, M.M. Antitumor activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology* 39: 33, 1982.
- MATHEWS-ROTH, M.M. Carotenoids and cancer prevention-experimental and epidemiological studies. *Pure & Appl. Chem.* 57: 717, 1985.
- MATSUNO, T.; TANI, Y.; MAOKA, T.; MATSUO, K. & KOMORI, T. Isolation and structural elucidation of cucurbitaxanthin A and B from pumpkin *Cucurbita maxima*. *Phytochem.* 25(12): 2837-2840, 1986.
- MATUS, Z.; DELI, J. & SZABOLCS, J. Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of β -cryptoxanthin 5,6-epoxide. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1907-1914, 1991.
- MATUS, Z.; BARANYAI, M.; TOTH, G. & SZABOLCS, J. Identification of oxo, epoxy and some *cis* carotenoids in HPLC. *Chromatographia* 14 (6): 337-340, 1981.
- MEJIA, L.A.; HUDSON, E.; MEJIA, E.G. de & VAZQUEZ, F. Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of Mexican peppers (*Capsicum annum*) as determined by HPLC. *J. Food Sci.* 53 (5): 1448-1451, 1988.
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agric. Food Chem.* 39 (6): 1094-1097, 1991.
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. *Chromatographia* 28 (5/6): 249-252, 1989.
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. *Intern. J. Food Sci. and Technol.* 25: 213-219, 1990.
- MERCADANTE, A.Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Desempenho da camada delgada versus camada delgada de alta eficiência multi-desenvolvimento para triagem de carotenóides. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 11 (2): 200-209, 1991.

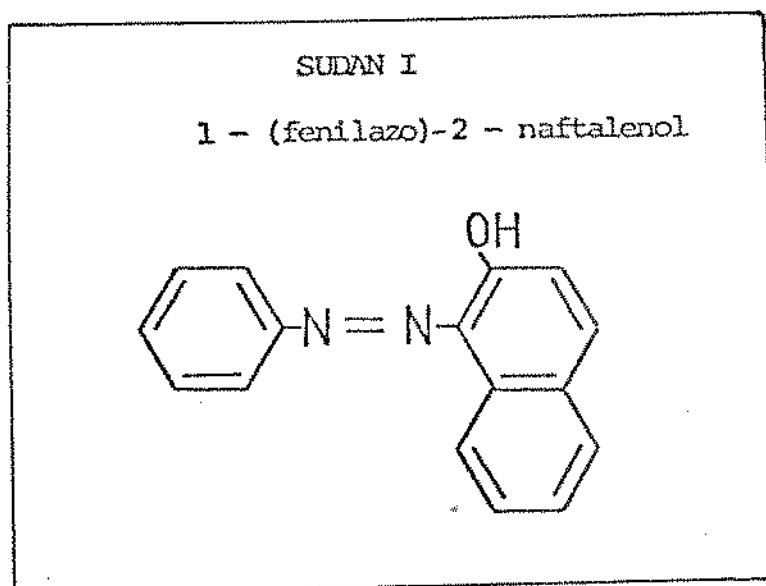
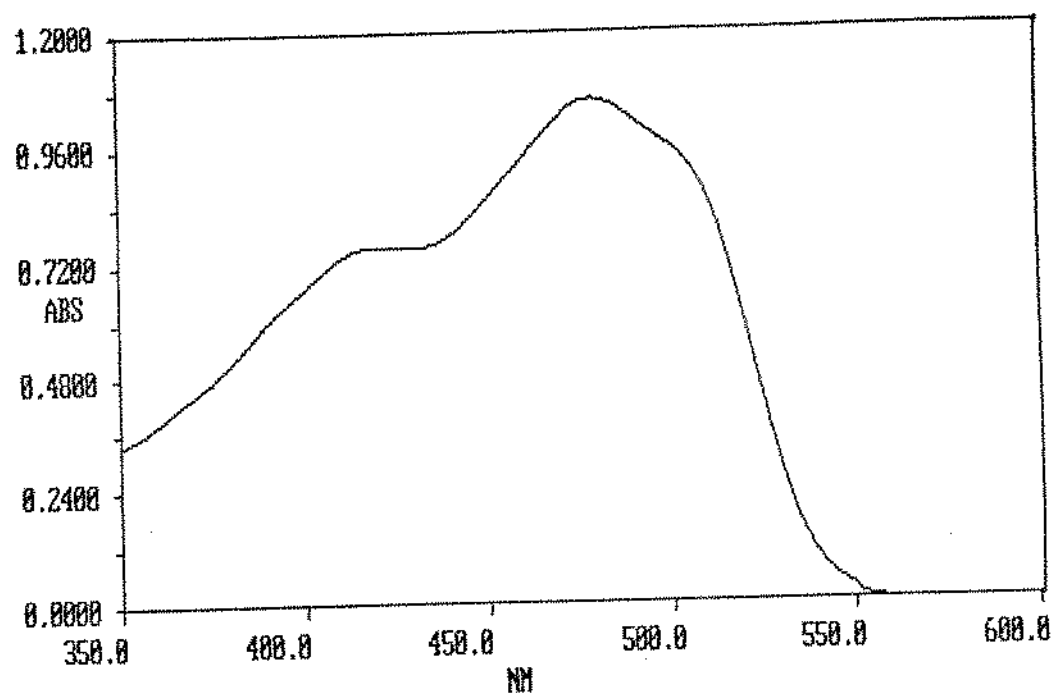
- MINGUEZ-MOSQUERA, M.I.; GANDUL-ROJAS, B. & GALLARDO-GUERRERO, M.L. Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin oil by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 40: 60-63, 1992.
- MOLNÁR, P. & SZABOLCS, J. Occurrence of 15-*cis*-violaxanthin in *Viola tricolor*. *Phytochem.* 19: 623-627, 1980.
- MORGA, S.N.; LUSTRE, A.O.; TUNAC, M.M.; BALAGOT, A.H. & SORIANO, M.R. Physico-chemical changes in Philippine carabao mangoes during ripening. *Food Chem.* 15: 225, 1979.
- NG, J.H. & TAN, B. Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detector. *J. Chromatogr. Sci.* 26: 463-469, 1988.
- NOGA, G. & LENZ, F. Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 17: 139-142, 1983.
- O'MAHONEY, M. Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures. Marcel Dekker Inc., New York, 1986. p. 279-302.
- PETTERSSON, A. & JONSSON, L. Separation of *cis-trans* isomers of alpha- and beta-carotene by adsorption HPLC and identification with diode array detection. *J. Micronutr. Anal.* 8: 23-41, 1990.
- PFANDER, H.; HADORN, M.; LACHNMEIER, A. & ENGLERT, G. Synthese von apocarotinoiden mit einer anders gelagerten methylgruppe; strukturaufklärung von citrus-carotinoiden. *Helv. Chim. Acta* 63 (3): 716-727, 1980.
- PFANDER, H.; RIESEN, R. & NIGGLI, U. HPLC and SFC of carotenoids: scope and limitations. *Pure & Appl. Chem.* 66 (5): 947-954, 1994.
- PHILIP, T. & CHEN, T-S. Quantitative analysis of major carotenoid fatty acid esters in fruits by liquid chromatography: persimmon and papaya. *J. Food Sci.* 53: 1720-1722, 1745, 1988a.
- PHILIP, T. & CHEN, T-S. Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 435: 113-126, 1988b.
- PHILIP, T.; CHEN, T-S. & NELSON, D.B. Liquid chromatographic profiles of major carotenoid esters in commercially processed California Navel and Valencia orange juice concentrates. *J. Chromatogr.* 442: 249-265, 1988.

- PHILIP, T.; CHEN, T-S. & NELSON, D.B. Detection of adulteration of California orange juice concentrates with externally added carotenoids by liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 37: 90-95, 1989.
- PRUTH, J.S. & LAL, G. Carotenoids in passion fruit juice. **Food Res.** 23: 505-510, 1958.
- QUACKENBUSH, F. W. Reverse phase HPLC separation of *cis* and *trans* carotenoids and its application to β -carotenes in food materials. **J. Liq. Chromatogr.** 10 (4): 643-653, 1987.
- 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 (5): 767-772, 1986.
- RAMARSANA, G.B.; RAO, S.D. & HAKIN, D.N. Carotenoid pigments of Badami mango fruit. **Biochem.** 40: 647, 1946.
- RAMOS, D.M.R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** 3: 147-155, 1987.
- RITEMBAUGH, C. Carotenoids and cancer. **Nutr. Today** jan/feb.: 14-19, 1987.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutr. Analysis** 5: 191-225, 1989.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrometry. **J. Chromatogr. Sci.** 25: 624-629, 1988.
- ROSE, M.E. Metastable ion techniques for the analysis of carotenoid isomers. In: "Carotenoid Chemistry & Biochemistry". Proceedings of the 6th International Symposium on Carotenoids. G.Britton e T.W.Goodwin (Eds.). Pergamon Press, Oxford, 1982.
- ROUCHAUD, J.; MOONS, C. & MEYER, J.A. The effects of selected herbicide and fungicide treatments on the carotenes and xanthophylls in lettuce. **J. Hort. Sci.** 60 (2): 245-249, 1985.
- ROUSEFF, R.L.; SADLER, G.D.; PUTNAM, T.J. & DAVIS, J.E. Determination of β -carotene and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. **J. Agric. Food Chem.** 40: 47-51, 1992.

- RUEDI, P. A powerful tool in carotenoid research. *Pure & Appl. Chem.* 57: 793-800, 1985.
- SADANA, J.C. & AHMAD, B. Observations in the carotenoids pigments of the mango fruit. *Indian J. Med. Res.* 34: 69, 1946.
- SCALIA, S. & FRANCIS, G.W. Preparative scale reversed-phase HPLC method for simultaneous separation of carotenoids and carotenoid esters. *Chromatogr.* 28 (3/4): 129-132, 1989.
- SCHWARTZ, S.J. & PATRONI-KILLAM, M. Detection of cis-trans carotene isomers by two dimensional thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33 (6): 1160-1163, 1985.
- SCOTT, K.J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.* 45 (5): 357-364, 1992.
- SCOTT, K.J. & HART, D.J. Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC -2: column temperature. *Food Chem.* 47 (4): 403-405, 1993.
- SIEFERMANN-HARMS, D.; HERTZBERG, S.; BORCH, G. & LIAAEN-JENSEN, S. Lactucaxanthin, an ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa*. *Phytochem.* 20: 85-88, 1981.
- SIMON, P.W. & WOLFF, X.Y. Carotenes in typical and dark orange carrots. *J. Agric. Food Chem.* 35: 1017-1022, 1987.
- SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 1: 351-374, 1981.
- SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd ed. John Wiley & Sons, new York, 1979. p. 549-556.
- SPEEK, A.J., TEMALILWA, C.R. & SCHRIJVER, J. Determination of β -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem.* 19 (1): 65-74, 1986.
- SPEEK, A.J.; SPEEK-SAICHUA, S. & SCHREURS, W.H.P. Total carotenoid and β -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chem.* 27: 245, 1988.
- STEWART, I. High performance liquid chromatography determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 132, 1977.

- STEWART, I. & WHEATON, T.A. Continuous flow separation of carotenoids by liquid chromatography. **J. Chromatogr.** 55: 325-336, 1971.
- STEWART, I. & WHEATON, T.A. Conversion of β -citraurin to reticulataxanthin and β -apo-8'-carotenal to citranaxanthin during the isolation of carotenoids from *citrus*. **Phytochem.** 12: 2947-2951, 1973.
- STRAUB, O. Key to Carotenoids. H. Pfander (Ed.). Birkhauser Verlag, Basel. 1987. 295 p.
- TAKAGI, S. Determination of green leaf carotenoids by HPLC. **Agric. Biol. Chem.** 49 (4): 1211-1213, 1985.
- TAYLOR, S.J. & McDOWELL, I.J. Rapid classification by HPLC of plant pigments in fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaf. **J. Sci. Food Agric.** 57: 287-291, 1991.
- THOMAS, P. Effect of post-harvest temperature on quality, carotenoids and ascorbic acid content of Alphonso mangoes on ripening. **J. Food Sci.** 40: 704, 1975.
- THOMAS, P & JANVE, M.T. . Effects of gamma irradiation and storage temperature on carotenoids and ascorbic acid content of mangoes on ripening. **J. Sci. Food Agric.** 26: 1503-1512, 1975.
- THOMPSON, J.N. Problem of official methods and new techniques for analysis of foods and feeds for vitamin A. **J. Assoc. Anal. Chem.** 69: 727-738, 1986.
- TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T. & KOYAMA, Y. Separation and identification of *cis/trans* β -carotenes by high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** 245: 559-564, 1982.
- VAL, J.; ABADIA, J.; HERAS, L. & MONGE, E. Higher plant photosynthetic pigment analysis. Determination of carotenoids and chlrophylls by HPLC. **J. Micronutr. Anal.** 2: 305-312, 1986.
- VECCHI, M.; ENGLERT, G.; MAURER, R. & MEDUNA, V. Trennung und charakterisierung von beta-carotin-isomeren. **Helv. Chim. Acta** 64: 2746-2758, 1981.
- VETTER, W.; ENGLERT, G.; RIGASSI, N. & SCHWIETER, U. Spectroscopic Methods. In: "Carotenoids". O. Isler (Ed.). Academic Press, New York, 1971. p. 190-266.
- WILBERG, V.C. Quantificação de provitaminas A e carotenóides majoritários de frutos e hortaliças por cromatografia líquida de alta eficiência. Tese de Doutorado. UNICAMP - Campinas. 1991.

- WRIGH, S.W. & SHEARER, J.D. Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. **J. Chromatogr.** 294: 281-295, 1984.
- YAMAMOTO, R.; OSIMA, Y. & GOMA, T. Carotenoid pigments of mangoes. **Science Paper of the Institute of Physical and Chemical Research** 19: 122, 1932.
- YAMAUCHI, N & WATADA, A.E. Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled or ethylene containing atmosphere. **J. Food Sci.** 58 (3): 616-618, 1993.
- YOKOYAMA, H. & WHITE, M.J. Citrus carotenoids. VIII. The isolation of semi- β -carotenone and β -carotenone from citrus relatives. **Phytochem.** 7: 1031-1034, 1968.



ANEXO 1: Espectro de absorção do Sudan I, em metanol, e sua fórmula estrutural.