

CAROTENÓIDES E VALORES DE VITAMINA A  
DE VERDURAS FOLHOSAS: MÉTODOS ANALÍ-  
TICOS, INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES  
E COMPOSIÇÃO EM VERDURAS FOLHOSAS  
NATIVAS

08/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROTENÓIDES E VALORES DE VITAMINA A  
DE VERDURAS FOLHOSAS: MÉTODOS ANALÍ-  
TICOS, INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES  
E COMPOSIÇÃO EM VERDURAS FOLHOSAS  
NATIVAS

ADRIANA ZERLOTTI MERCADANTE  
Engenheira de Alimentos

Orientadora

Dra. DÉLIA RODRIGUEZ-AMAYA

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

1989

*Parceira*  
Esta exemplar corresponde a redação final da  
tese defendida por Adriana Zerlotti Mercadante e aprova-  
da pelo Conselho Julgador em 22 de março de 1989.

*Campinas, 22 de março de 1989.*

*Délia R. A.*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Profa. Dra. Délia Rodriguez-Amaya*

À minha mãe, Leila

Às minhas irmãs.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Délia Rodriguez-Amaya, pela valiosa orientação, paciência, constante disponibilidade, e por sua amizade.

À Profa. Gabriela Stangenhau, pela análise estatística realizada.

Ao Prof. Paulo A. Bobbio por permitir a utilização do espectrofotômetro no laboratório de Química de Alimentos durante todo o trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Análise de Alimentos, em especial à Helena, que de uma forma ou de outra contribuíram durante todo o trabalho.

À UNICAMP, pela bolsa Incentivo Acadêmico e pelo suporte financeiro da pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de pós-graduação.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro da pesquisa.

À ABIA, pelas cópias desta tese.

## ÍNDICE

|                                                                                     | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....                                                              | iv     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                              | vi     |
| RESUMO.....                                                                         | viii   |
| SUMMARY.....                                                                        | xi     |
| <br>                                                                                |        |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                  | 001    |
| <br>                                                                                |        |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                                            |        |
| 2.1. Carotenóides e suas funções.....                                               | 003    |
| 2.2. Composição qualitativa de carotenóides em folhas.....                          | 007    |
| 2.3. Métodos para a determinação de carotenóides em<br>verduras folhosas.....       | 012    |
| 2.4. Fatores que influem na composição de carotenóides<br>em verduras folhosas..... | 022    |
| <br>                                                                                |        |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS                                                               |        |
| 3.1. Materiais.....                                                                 | 026    |
| 3.2. Método de Rodriguez et al. (1976 a).....                                       | 026    |
| 3.2.1. Extração.....                                                                | 027    |
| 3.2.2. Cromatografia em coluna.....                                                 | 028    |
| 3.2.3. Identificação.....                                                           | 029    |

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.4. Determinação quantitativa.....                                 | 031 |
| 3.2.5. Cálculo do valor de vitamina A.....                            | 031 |
| 3.3. Método de Simpson et al. (1987).....                             | 032 |
| 3.3.1. Extração.....                                                  | 032 |
| 3.3.2. Saponificação.....                                             | 033 |
| 3.3.3. Cromatografia em coluna, identificação e<br>quantificação..... | 033 |
| 3.4. Método de fase reversa modificado.....                           | 034 |
| 3.4.1. Extração.....                                                  | 034 |
| 3.4.2. Cromatografia em coluna, identificação e<br>quantificação..... | 035 |
| 3.5. Análise de outros vegetais e frutas.....                         | 036 |
| 3.6. Avaliação da recuperação de beta-caroteno.....                   | 037 |
| 3.7. Análise estatística.....                                         | 038 |

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1. Comparação entre métodos que utilizam coluna abert<br>ta de fase normal e reversa.....                    | 039 |
| 4.1.1. Recuperação de beta-caroteno padrão.....                                                                | 039 |
| 4.1.2. Comparação entre três métodos para a deter-<br>minação de pró-vitamina A em verduras fo-<br>lhosas..... | 043 |
| 4.1.3. Análise qualitativa de outros vegetais e<br>frutas.....                                                 | 046 |
| 4.2. Composição qualitativa de carotenóides em verduras<br>folhosas verdes.....                                | 051 |

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. Influência de cultivar, estação do ano e de condições de cultivo em couve..... | 060 |
| 4.4. Composição quantitativa de carotenóides em verduras folhosas nativas.....      | 080 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                                                  | 095 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                     | 097 |
| ANEXOS.....                                                                         | 115 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                         | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Composição qualitativa de carotenóides em folhas.....                                                                                | 009    |
| 2. Recuperação de beta-caroteno.....                                                                                                    | 041    |
| 3. Comparação entre métodos para a determinação de pró-<br>vitamina A em verduras folhosas.....                                         | 044    |
| 4. Características dos carotenóides presentes em verdu-<br>ras folhosas verdes.....                                                     | 052    |
| 5. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de<br>couve manteiga, colhida no verão, proveniente de hor-<br>ta natural.....      | 062    |
| 6. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de<br>couve manteiga, colhida no verão, proveniente de hor-<br>ta convencional..... | 063    |
| 7. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de<br>couve manteiga, colhida no inverno, proveniente de<br>horta natural.....      | 064    |
| 8. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de<br>couve tronchuda, colhida no verão, proveniente de<br>horta natural.....       | 065    |
| 9. Composição de carotenóides e valor de vitamina A de<br>couve tronchuda, colhida no inverno, proveniente de<br>horta natural.....     | 066    |



|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 10. Composição média de carotenóides e valor de vitamina A de couve cultivar manteiga..... | 077 |
| 11. Composição de carotenóides em caruru ( <i>Amaranthus viridis</i> L.).....              | 086 |
| 12. Composição de carotenóides em mentruz ( <i>Lepidium pseudodidymum</i> Thell.).....     | 087 |
| 13. Composição de carotenóides em taioba ( <i>Colocasia esculenta</i> L.).....             | 088 |
| 14. Composição de carotenóides em serralha ( <i>Sonchus oleraceus</i> L.).....             | 089 |
| 15. Composição de carotenóides em beldroega ( <i>Portulaca oleracea</i> L.).....           | 090 |
| 16. Valor de vitamina A das cinco verduras folhosas nativas.....                           | 093 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                   | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Caminho biossintético dos carotenóides em plantas verdes.....                                                                  | 010    |
| 2. Separação de pró-vitaminas A em verduras folhosas por três métodos.....                                                        | 045    |
| 3. Separação de pró-vitaminas A em abóbora cultivar menina verde por três métodos.....                                            | 047    |
| 4. Separação de pró-vitaminas A em tomate por três métodos.....                                                                   | 048    |
| 5. Separação de pró-vitaminas A em mamão vermelho por três métodos.....                                                           | 050    |
| 6. Estruturas dos carotenóides identificados em verduras folhosas verdes.....                                                     | 053    |
| 7. Separação dos carotenóides de verduras folhosas verdes em coluna.....                                                          | 054    |
| 8. Separação dos carotenóides de verduras folhosas em placa de sílica gel desenvolvida por 3% de metanol benzeno.....             | 055    |
| 9. Separação de carotenóides de verduras folhosas em placa de sílica gel desenvolvida por 30% de acetona em éter de petróleo..... | 055    |

|                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 10. Espectros de absorção em éter de petróleo de (—)                                              |     |
| $\beta$ - caroteno e zeaxantina, (---) $\alpha$ -criptoxantina e luteína, (...) violaxantina..... | 057 |
| 11. Espectros de absorção da violaxantina em etanol 95%                                           |     |
| (---) e após adição de HCl 0,1N (---).....                                                        | 059 |
| 12. Comparação dos teores de $\beta$ -caroteno em couve.....                                      | 067 |
| 13. Comparação dos teores de zeaxantina em couve.....                                             | 068 |
| 14. Comparação dos valores de vitamina A em couve.....                                            | 069 |
| 15. Comparação dos teores de luteína em couve.....                                                | 070 |
| 16. Comparação dos teores de violaxantina em couve.....                                           | 071 |
| 17. Comparação dos teores totais de carotenóides em couve                                         | 072 |
| 18. Distribuição dos carotenóides em caruru .....                                                 | 081 |
| 19. Distribuição dos carotenóides em mentruz .....                                                | 082 |
| 20. Distribuição dos carotenóides em taioba .....                                                 | 083 |
| 21. Distribuição dos carotenóides em serralha .....                                               | 084 |
| 22. Distribuição dos carotenóides em beidroega .....                                              | 085 |

## RESUMO

Devido ao alto custo de cromatografia líquida de alta eficiência, propõe-se o uso de fase reversa C-18, como adsorvente, em coluna aberta, como alternativa para países do terceiro mundo. Foram comparados, então, métodos utilizando coluna de fase reversa desenvolvida com acetonitrila:metanol:clorofórmio (Simpson et al., 1987) e também por acetona:água (fase reversa modificado), e coluna de MgO:hiflosupercel (fase normal) desenvolvida por concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (Rodriguez et al., 1976). As porcentagens de recuperação do  $\beta$ -caroteno nas colunas foram 98, 96 e 98% e do procedimento analítico completo ( $\beta$ -caroteno adicionado à couve) 92, 89 e 92 %, respectivamente, para os métodos de Rodriguez et al., de Simpson et al. e de fase reversa modificado. Não houve diferença significativa entre o método de fase reversa modificado e o de Rodriguez et al. quanto à quantidade de pró-vitamina A (exclusivamente  $\beta$ -caroteno) em verduras folhosas. Já o de Simpson et al. apresentou um teor significativamente menor de  $\beta$ -caroteno. A coluna de fase normal foi a única capaz de separar todos os carotenóides. Para alimentos que contém outras pró-vitaminas A, além do  $\beta$ -caroteno, a análise torna-se ainda mais complexa. Para abóbora, os dois tipos de adsorventes podem ser usados para separar  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno; en-

quanto que para tomate e mamão vermelho, o uso de fase reversa não é recomendado devido à presença de licopeno que se mistura com  $\beta$ -caroteno, embora ocorra a separação de  $\beta$ -criptoxantina. Mais uma vez, somente a coluna de MgO:hiflosupercel permite a determinação da composição completa de carotenóides.

Os efeitos de diversos fatores na composição de carotenóides foram avaliados utilizando o método de Rodriguez et al. em amostras de couve. Os seguintes resultados foram obtidos: 1-A cultivar tronchuda apresentou maior concentração de  $\beta$ -caroteno e valor de vitamina A, e menor de zeaxantina que a manteiga no inverno e verão; 2-Os teores de luteína, violaxantina e total de carotenóides foram significativamente maiores na cultivar tronchuda apenas no verão; 3- $\beta$ -Caroteno, valor de vitamina A e zeaxantina apresentaram-se significativamente maiores no inverno nas duas cultivares; 4-Os teores de luteína e total de carotenóides foram também maiores no inverno na couve manteiga; 5-O conteúdo de violaxantina apresentou-se maior no verão na couve tronchuda; 6-Os teores de  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina violaxantina, total de carotenóides e valor de vitamina A de couve manteiga proveniente da horta natural foram significativamente maiores que os da horta convencional, que utilizou herbicida e inseticida.

Foi também determinada a composição completa de carotenóides em cinco verduras folhosas nativas brasileiras. A luteína esteve presente em maior quantidade, perfazendo 59, 58, 61, 60 e 54% do total em caruru, mentruz, taioba, serralha e beldroega, respectivamente. Os teores de  $\beta$ -caroteno e valores de vitamina A

foram 109,85 e 1838,1; 84,65 e 1410,8; 67,32 e 1123,0; 62,86 e 1050,0; 29,79  $\mu\text{g/g}$  e 499,3 RE/100g, respectivamente. As xantofilas  $\alpha$ -criptoxantina, violaxantina e zeaxantina também foram quantificadas.

## SUMMARY

Considering the high cost of HPLC, the use of preparative C-18 packing material as stationary phase in classical open columns has been proposed as an alternative for the third world. In the present study, three methods were compared, two utilizing C-18 reverse phase columns developed with  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$  (Simpson et al., 1987) or with decreasing concentrations of water in acetone (modified reverse phase method) and one utilizing the normal phase  $\text{MgO}:\text{HylfoSupercel}$  column, developed with increasing concentration of acetone in petroleum ether (Rodriguez et al., 1976). Percent recoveries of  $\beta$ -carotene from the columns were 98, 96 and 98% and of the entire analysis ( $\beta$ -carotene added to kale) 92, 89 and 92%, respectively, for the Rodriguez et al., Simpson et al. and the modified RP methods. No significant difference was observed in the provitamin A contents (exclusively  $\beta$ -carotene) of 2 leafy vegetables obtained by the modified reverse phase and normal phase methods. Significantly lower values were obtained by the method of Simpson et al.. Only the normal phase column was capable of separating all constituent carotenoids. The situation became more complicated when samples containing other provitamins were analyzed. For squash the two types of stationary phase could separate  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene. For tomato and red-fleshed papaya, part of lycopene remained mixed with  $\beta$ -caro-

tene, although  $\beta$ -cryptoxanthin was separated. Once again, only the MgO:HyfloSupercel permitted separation of the different carotenoids.

The effects of certain factors on the carotenoid composition were evaluated utilizing the method of Rodriguez et al. and kale as sample. The following results were obtained: 1-The cultivar "tronchuda" presented higher concentration of  $\beta$ -carotene and vitamin A value and lower zeaxanthin than the cultivar "manteiga" during both the winter and summer seasons; 2-The lutein, violaxanthin and total carotenoid levels were significantly higher in the cultivar "tronchuda" but only in the summer; 3- $\beta$ -Carotene, vitamin A value and zeaxanthin were significantly higher during winter in both cultivars; 4-The lutein and total carotenoid levels were also significantly higher in the winter in the kale "manteiga"; 5-Violaxanthin was significantly higher in the cultivar "tronchuda" in the summer; 6-Significantly higher levels of  $\beta$ -carotene, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, total carotenoid and vitamin A value were observed in the kale "manteiga" cultivated on a "natural" farm as compared to a conventional farm which utilized herbicide and insecticide.

The complete carotenoid composition of five native Brazilian leafy vegetables were determined. Lutein was the principal pigment, accounting for 59, 58, 61, 60, and 54% of the total in "caruru", "mentruz", "taioaba", "serralha" and "beldroega", respectively. The  $\beta$ -carotene contents and vitamin A values were 109,85 and 1838,1; 84,65 and 1410,8; 67,32 and 1123,0; 62,86



and 1050,0; 29,79  $\mu\text{g/g}$  and 499,3 RE/100g, respectively. The xanthophylls  $\alpha$ -cryptoxanthin, violaxanthin and zeaxanthin were also quantified.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, pesquisadores da área de análise de alimentos e nutrição vêm chamando a atenção para que estudos sejam realizados no sentido de se obter dados referentes à composição vitamínica de alimentos nacionais. As tabelas utilizadas no país são provenientes do exterior, não refletindo assim a realidade brasileira. No caso de pró-vitamina A, a situação é mais grave ainda, uma vez que os valores presentes em tabelas internacionais são duvidosos devido à complexidade da metodologia analítica. Ao mesmo tempo que se procura corrigir os erros dos métodos existentes, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais simples, rápidos e econômicos.

A composição de carotenóides e o valor de vitamina A de vários alimentos nacionais já foram determinados em nosso laboratório (Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981a, b; Rodriguez-Amaya et al., 1983; Padula & Rodriguez-Amaya, 1986; Kimura & Rodriguez-Amaya, 1987; Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987; Godoy & Rodriguez-Amaya, 1988 e Arima & Rodriguez-Amaya, 1988 a,b).

A atividade de vitamina A de alguns carotenóides é de grande importância para países em desenvolvimento, onde a deficiência de vitamina A é considerada um sério problema nutricional. Em muitos países em desenvolvimento, onde o custo dos ali-

mentos de origem animal é alto, a contribuição de carotenóides provenientes de vegetais e frutas é ainda mais significativa (Rodriguez-Amaya, 1985). A utilização de verduras folhosas na alimentação humana deve ser incentivada, porque são fontes altamente ricas em pró-vitamina A em comparação com frutas como goiaba, mamão, manga e tomate, além de serem disponíveis praticamente o ano inteiro.

A determinação da composição completa de carotenóides também é necessária, pois estudos recentes indicaram que os carotenóides, não apenas os que possuem atividade pró-vitáminica A, exercem ações anti-câncer e anti-úlceras gástricas (Matthews-Roth, 1981 e 1985; Jávor et al., 1983).

Embora a tendência dos carotenóides em variar qualitativamente e quantitativamente em função de fatores naturais e genéticos tenha sido muito citada na literatura, há pouquíssimos trabalhos que quantificam estes efeitos.

O presente estudo teve como objetivos: 1-desenvolver um método rápido e relativamente barato para a determinação de pró-vitaminas A; 2-avaliar métodos para a determinação de carotenóides e pró-vitaminas A por cromatografia de coluna aberta; 3-determinar e avaliar a influência de fatores como cultivar, condições climáticas e de cultivo no teor de carotenóides em hortaliças folhosas; e 4-determinar o conteúdo de carotenóides e valor de vitamina A em verduras folhosas nativas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CAROTENÓIDES E SUAS FUNÇÕES

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em fungos, bactérias, animais, em todos os tecidos de plantas verdes e também em partes de plantas não fotossintéticas como frutas, flores, sementes e raízes (Simpson & Chichester, 1981).

Nas plantas, somente as ações dos carotenóides como pigmento auxiliar na absorção de energia para a fotossíntese e como agente fotoprotetor da clorofila estão completamente elucidadas. No entanto, outras funções têm lhes sido atribuídas: transportadores de oxigênio (ação dos epóxidos), cofatores de reações fotossintéticas, fototropismo e fotorecepção (Krinsky, 1971 e Whittingham, 1976). A presença de carotenóides nas flores serve, ainda, para atrair insetos para a polinização (Klaui & Bauernfeind, 1981).

No homem, a função universalmente conhecida é a atividade pró-vitáminica A de alguns carotenóides. As pró-vitaminas A constituem a maior fonte de vitamina A da dieta, contribuindo com uma média de 68% mundialmente e 82% nos países em desenvolvimento (Simpson, 1983). Para atuar como precursor de vitamina A, o caro-

tenóide deve possuir pelo menos um anel  $\beta$ -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com no mínimo 11 carbonos.

Heywood et al. (1985) avaliaram a possível toxidez do  $\beta$ -caroteno e constataram a ausência de propriedades mutagênicas, embriotoxicidade, interferência na reprodução e tumorigenicidade. Já a ingestão de vitamina A em excesso (hipervitaminose A) é amplamente conhecida como nociva à saúde.

Recentemente o interesse em carotenóides e vitamina A como agentes potenciais inibidores de câncer tem aumentado. Matthews-Roth (1985), numa revisão de diversos estudos epidemiológicos em seres humanos, verificou que em 33 artigos publicados, com excessão de 4, foi confirmada a relação inversa entre a ingestão de vegetais contendo carotenóides e a incidência de câncer. Ainda em estudos epidemiológicos em seres humanos, Peto et al. (1981) e Shekelle et al. (1981) relataram que o responsável pela diminuição do risco de câncer de pulmão era o  $\beta$ -caroteno e não o retinol, ambos provenientes da dieta. Mais recentemente, Colditz et al. (1985) demonstraram que o aumento na ingestão de carotenóides em idosos protegia-os contra o câncer.

Os carotenóides são sequestradores de oxigênio "singlet" e radicais livres, o que os torna protetores dos lípidos contra a oxidação, embora às custas de sua própria destruição (Burton & Ingold, 1984). Baseado nesta propriedade, surgiu a hipótese que o  $\beta$ -caroteno pode impedir o início de reações danosas, como a oxidação dos lípidos, e através deste processo proteger contra a formação de câncer (Oberley & Buettner, 1979 e Ames,

1983).

Os carotenóides preveniram ou retardaram o crescimento de tumores de pele, em ratos, induzidos por raios UV-B. Os pigmentos sem atividade pró-vitamínica A não tiveram efeito quando a indução de tumores foi feita com DMBA (dimetil benzeno antraceno) e "croton oil". Já o fitoeno não inibiu tumores induzidos por DMBA junto com raios UV-B, e a cantaxantina apresentou efeito, porém, em menor grau que o  $\beta$ -caroteno (Mathews-Roth, 1982).

Jávor et al. (1983) verificaram que a vitamina A,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e luteína diminuíram significativamente as lesões agudas da mucosa gástrica em ratos, causada por administração de HCl 0,6 M. Os carotenóides capsorubina, capsantina, capsantol e licopeno não apresentaram esta propriedade.

Outra aplicação em medicina é devido à capacidade protetora dos carotenóides em prevenir a fotossensibilização em pacientes com certas doenças de pele fotossensíveis. Em 1975, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o  $\beta$ -caroteno para tratamento de pessoas fotossensíveis (Mathews-Roth, 1981).

Khacik et al. (1986), baseados nas informações de que os carotenóides possuem atividades anti-câncer e anti-gástrica, enfatizaram a importância de se determinar a composição total de carotenóides em alimentos.

Os carotenóides ainda apresentam ampla utilidade para o homem devido ao seu poder corante que pode variar do amarelo ao vermelho. São corantes naturais de frutas, vegetais, certos peixes e crustáceos. Podem ser acrescidos aos alimentos, conferindo

ou intensificando a cor em sucos de frutas, pastas alimentícias, bebidas, doces, margarinas, queijos, salsichas e outros. Indiretamente, através da dieta, servem para intensificar a cor da gema de ovo, da pele de frango e do leite. Podem ainda ser usados para colorir cápsulas de medicamentos e cosméticos (Klaui & Bauernfeind, 1981).

## 2.2. COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM FOLHAS

Segundo Goodwin (1976), os tecidos de plantas superiores verdes possuem quatro carotenóides principais:  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Os pigmentos que aparecem esporadicamente, em pequenas quantidades, são:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina e anteraxantina. Os carotenóides estão localizados nos cloroplastos e as xantofilas, ao contrário das de frutas, encontram-se desesterificadas.

Os carotenóides  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina foram encontrados em diversas folhas (Hirayama & Oido, 1969; Gross et al., 1973; Eskins et al., 1977; Iriyama et al., 1978 e 1980; Braumann & Grimme, 1981; Sadowski & Wojcik, 1983; Rouchaud et al., 1984 e 1985; Takagi, 1985 e Khacik et al., 1986).

Além dos carotenóides principais, ainda foram encontrados  $\beta$ -criptoxantina (Rouchaud et al., 1984 e 1985), zeaxantina (Rouchaud et al., 1985) e anteraxantina (Takagi, 1985) em alface; e zeaxantina (Hirayama & Oido, 1969), 5,6 epóxido de luteína, neoxantina e anteraxantina (Braumann & Grimme, 1981), neocromo e epóxido de luteína (Khacik et al., 1986) em espinafre. Em folhas de mostarda, Takagi (1985) detectou anteraxantina e em folhas de abacate, foram encontrados isoluteína, zeaxantina, anteraxantina, luteoxantina, neocromo e  $\delta$ -caroteno (Gross et al.,



1973).

O  $\alpha$ -caroteno foi detectado em couve (Bushway, 1985), alface (Bureau & Bushway, 1986), hortaliças do norte brasileiro (Pentado et al., 1986), folhas de feijão (Sadowski & Wojcik, 1983), folhas de abacate (Gross et al., 1973) e folhas de mostarda, couve chinesa e taioba (Rodriguez, 1988).

Apesar de não citado por Goodwin (1976), o carotenóide  $\alpha$ -criptoxantina foi encontrado, em pequenas quantidades, em alface (Rouchaud et al., 1985) e em diversas hortaliças consumidas no Brasil (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987).

A Tabela 1 mostra um resumo dos dados discutidos até o momento e a Figura 1 (Goodwin, 1966) demonstra o caminho biossintético dos carotenóides em plantas superiores verdes.

Na maioria dos trabalhos, os autores separaram e quantificaram somente o  $\beta$ -caroteno (Fitzgerald & Fellers, 1938; Fellers & Buck, 1941; Burger et al., 1956; Booth, 1957; Sood & Bhat, 1974; Begum & Pereira, 1977; Farrow et al., 1979; Gomez, 1981; Klein & Perry, 1982; Bureau & Bushway, 1986; Bushway, 1986; Pentado et al., 1986 e Speek et al., 1986 e 1988), uma vez que o objetivo era apenas a determinação do valor de vitamina A. Além de  $\beta$ -caroteno, Ramos & Rodriguez-Amaya (1987) também quantificaram luteína para demonstrar o grau de erro quando a separação de carotenóides não é realizada.

TABELA 1: Composição qualitativa de carotenóides em folhas<sup>1</sup>.

| FOLHAS                 | CAROTENÓIDES                      | TÉCNICA CROMA-GRÁFICA | REFERÊNCIAS              |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| espinafre              | 2,6,10,11 e 12                    | CCD                   | Hirayama & Oido (1956)   |
|                        | 2,6,10 e 11                       | CLAE                  | Eskins et al. (1977)     |
|                        | 2,6,10 e 11                       | CLAE                  | Iriyama et al. (1978)    |
|                        | 2,6,10 e 11                       | CCD                   | Iriyama et al. (1980)    |
| espinafre e couve      | 1,2,6,9,10,11 e 13                | CLAE                  | Braumann & Grimme (1981) |
|                        | 2,6,9,10,11,14,15, 16,17,18, e 19 | CLAE                  | Khacik et al. (1986)     |
| alface                 | 2,5,6,10 e 11                     | CCD                   | Rouchaud et al. (1984)   |
| alface e mostarda      | 2,4,5,6,10,11 e 12                | CCA                   | Rouchaud et al. (1985)   |
|                        | 2,6,10,11 e 13                    | CLAE                  | Takagi (1985)            |
| mostarda               | 1,2,6,10 e 11                     | CCA                   | Rodriguez (1988)         |
| couve chinesa e taioba | 1,2 e 6                           | CCA                   | Rodriguez (1988)         |
| de feijão              | 1,2,6,10,11,20,21, 22 e 23        | CCD                   | Sadowski & Wojcik (1983) |
| de abacate             | 1,2,3,6,7,8,10,11, 12,13 e 14     | CCA e CCD             | Gross et al. (1973)      |

1:Relacionou-se apenas os trabalhos onde foi determinada a composição completa de carotenóides.

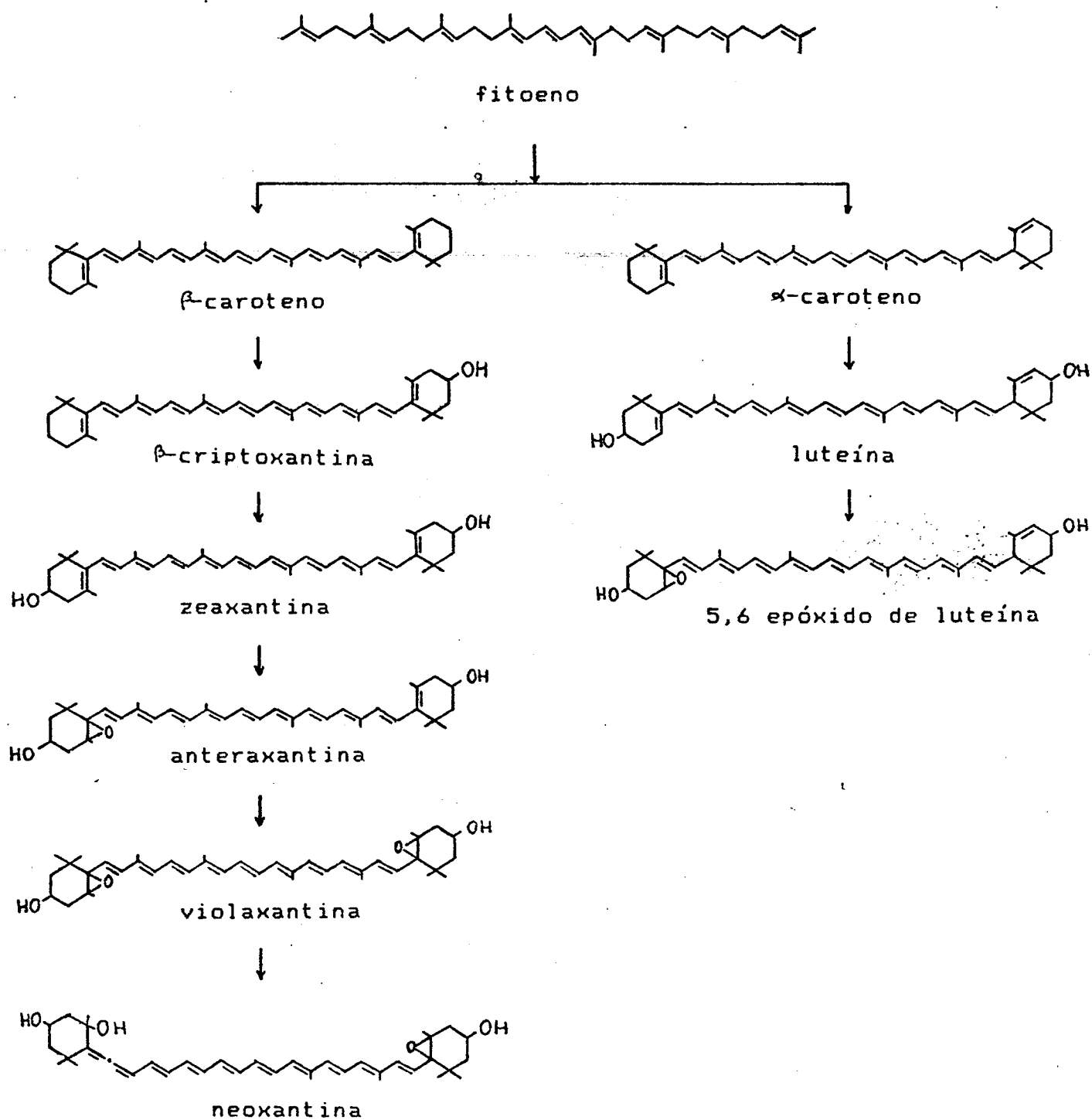
CCA: cromatografia em coluna aberta

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

#### CAROTENÓIDES:

|                             |                                         |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
| 01. $\alpha$ -caroteno      | 13. anteraxantina                       |
| 02. $\beta$ -caroteno       | 14. neocromo                            |
| 03. $\gamma$ -caroteno      | 15. 9 <u>cis</u> neoxantina             |
| 04. $\alpha$ -criptoxantina | 16. <u>cis</u> epóxido de luteína       |
| 05. $\beta$ -criptoxantina  | 17. neo luteína B                       |
| 06. luteína                 | 18. neo luteína B'                      |
| 07. luteoxantina            | 19. neo luteína A                       |
| 08. isoluteína              | 20. 5,6,5',6' diepóxi $\beta$ -caroteno |
| 09. epóxido de luteína      | 21. taraxantina                         |
| 10. violaxantina            | 22. cetohidroxi licopeno                |
| 11. neoxantina              | 23. licopeno                            |
| 12. zeaxantina              |                                         |



**FIGURA 1:** Caminho biossintético dos carotenóides em plantas verdes (Goodwin, 1966).

Apesar do espinafre estudado por Khacik et al. (1986) apresentar cis e epóxi carotenóides, ainda assim os teores de luteína, neoxantina e carotenóides totais foram cerca de duas vezes, o de  $\beta$ -caroteno uma vez e meia e o de violaxantina quatro vezes maiores que os obtidos por Hirayama & Oido (1956). É interessante salientar que a razão luteína/ $\beta$ -caroteno, nestes dois trabalhos, foi aproximadamente 2. Já em couve Khacik et al. (1986) obtiveram o valor 2,5 para esta razão e Rouchaud et al. (1984 e 1985) obtiveram o valor 1 em alface.

Embora a composição de carotenóides em folhas não seja tão complexa como em certos vegetais como *Momordica charantia* (Rodriguez et al., 1976a), abóbora e moranga (Arima & Rodriguez-Amaya, 1988 a,b) e nas frutas tais como: *Cyphomandra betacea* (Rodriguez-Amaya et al., 1985), maracujá (Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981a), cajú (Cecchi & Rodriguez-Amaya, 1981b), goiaba (Padula & Rodriguez-Amaya, 1986) e manga (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1988), ainda assim ocorrem muitas discrepâncias entre os resultados qualitativos e quantitativos, que pode ser devido ao uso de diferentes métodos analíticos e a influência de diversos fatores como cultivar, localização geográfica, clima e outros. Cabe lembrar, ainda, que a grande maioria dos trabalhos não especifica as cultivares utilizadas, época do ano em que foi feita a coleta de amostras e estágio de maturação na época de colheita, tornando muito difícil a comparação de resultados.

### 2.3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM VERDURAS FOLHOSAS

Embora os métodos mais utilizados para a análise de nutrientes em alimentos sigam os da AOAC (1984), necessita-se de uma nova metodologia em algumas áreas (Goddard & Matthews, 1979). Cecchi & Rodriguez-Amaya (1981a), Beecher & Khacik (1984) e Rodriguez-Amaya (1985) enfatizaram em seus trabalhos a necessidade de reavaliar os dados presentes nas tabelas de composição de alimentos no que se refere aos teores de carotenóides.

No Brasil os valores de vitamina A citados na tabela de composição de Franco (1982) são atualmente considerados duvidosos, pois além de não citar qual o método usado, não há referência sobre a procedência dos dados.

Para que as tabelas de composição de alimentos sejam amplamente aceitas, Goddard & Matthews (1979) recomendaram que estas incluam as seguintes informações: cultivar, localidade do plantio, transporte até comercialização, tipo de processamento e estocagem. E ainda, que os especialistas em alimentos incluam em seus trabalhos descrição da amostra, da técnica de amostragem, da metodologia utilizada e o número de amostras analisadas, pois essas informações são de grande importância para a confiabilidade dos resultados.

Rodriguez-Amaya (1988) alerta para o fato de que os resultados obtidos da análise de um único lote são duvidosos e que a especificação de cultivar ou variedade, estágio de maturação e porção do alimento analisada também é necessária.

Os métodos para determinação de carotenóides e valor de vitamina A podem ser divididos basicamente em 3 tipos: os que utilizam cromatografia em coluna aberta, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou ainda cromatografia em camada delgada (CCD).

Como os carotenóides são pigmentos susceptíveis à ação da luz e oxigênio, sofrem maior degradação na superfície exposta da camada delgada (Davies, 1976). Ainda há a dificuldade na quantificação que consiste em raspagem das manchas após desenvolvimento da placa, extração dos pigmentos da sílica com um solvente apropriado e quantificação em espectrofotômetro. Estas etapas, principalmente a raspagem, podem acarretar perdas de carotenóides.

A maioria dos trabalhos que fazem uso da coluna aberta para obter a separação de carotenóides utilizam como adsorventes mistura ativada ou não de MgO:hiflosupercel nas proporções de 1:1 ou 1:2 ou alumina neutra.

Dos adsorventes, óxido de magnésio, alumina, microcel C e sílica gel, que podem ser usados na separação de carotenóides, o óxido de magnésio (MgO) foi o que causou menor alteração no espectro de absorção do  $\beta$ -caroteno, enquanto sílica gel causou o maior efeito hipsochrômico (Tanaka et al., 1981). Já o  $\beta$ -caroteno

sofreu hidroxilação na posição 4 do anel aromático quando foi exposto ao microcel C com solventes não polares (ex. éter de petróleo) (Rodriguez et al., 1976b). Rodriguez et al. também relataram perdas de  $\beta$ -caroteno de 36, 32, 30, 20, 19 e 1% quando este foi exposto por 30 minutos a 20 gramas dos seguintes adsorventes: alumina, "kieselgur", sílica gel, MgO, celite e hiflosupercel, respectivamente.

O único autor que constatou degradação significativa de carotenóides em coluna de MgO:hiflosupercel (1:1) ativado foi Rouchaud et al. (1984), e devido a isso escolheram cromatografia em camada delgada para efetuar a separação de carotenóides. Mas enquanto nas placas de MgO não houve degradação dos carotenóides, nas placas de sílica gel ocorreu a transformação de violaxantina e neoxantina em auroxantina e luteoxantina, respectivamente.

O método da AOAC (1984) para carotenóides pró-vitamínicos, apesar de separar carotenóides apolares dos polares através de uma coluna de MgO:hiflosupercel (1:1) ativado, não separa os carotenóides individualmente. Portanto, não é apropriado para alimentos que contém  $\alpha$ -caroteno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -criptoxantina,  $\gamma$ -caroteno, monoepóxidos de  $\beta$ -caroteno e criptoxantina, pois esses carotenóides (50% de atividade) são quantificados como  $\beta$ -caroteno (100% de atividade). Os carotenóides inativos zeinoxantina,  $\delta$ -,  $\gamma$ -caroteno e  $\alpha$ -zeacaroteno, se presentes, também são quantificados como  $\beta$ -caroteno e nesse caso o valor de vitamina A obtido é muito maior que o real (Rodriguez-Amaya et al., 1988).

Para a determinação do valor de vitamina A em verduras folhosas, o método da AOAC não apresenta problemas com carotenóides interferentes (Rodriguez-Amaya et al., 1988). Entretanto esse método apresenta outros problemas tais como: extração incompleta devido ao uso de um volume fixo de solvente, leitura espectrofotométrica a 436 nm que não corresponde ao comprimento máximo de absorção do  $\beta$ -caroteno e uso de quantidade fixa de amostra.

Os métodos recomendados pela Cooperação Européia em Ciência e Tecnologia (COST 91) para a determinação do valor de vitamina A (Brubacker et al., 1985) utiliza alumina desativada como adsorvente na coluna. Segundo os autores, este método não separa os carotenos entre si e os isômeros, mas devido à pequena quantidade de  $\alpha$ -caroteno e isômeros nos alimentos, esta separação não é necessária. Neste caso, o valor de vitamina A é superestimado em cenoura e abóbora, por exemplo, que possuem teores consideráveis de  $\alpha$ -caroteno (Lee, 1986 e Arima & Rodriguez-Amaya, 1988). Por outro lado, como as xantofilas permanecem no topo da coluna, o valor de vitamina A é subestimado quando o alimento contém  $\alpha$ - e  $\beta$ -criptoxantina. Embora os autores citem no resumo que os vegetais são extraídos exaustivamente, na descrição detalhada do método, a extração é repetida três vezes com um volume fixo de solvente. Outros problemas que o método pode acarretar são: não retirada completa do álcali devido ao uso de volume fixo de água, uso de alta temperatura (50°C) de evaporação que pode causar degradação dos carotenóides e a etapa de retirada da água residual que é feita adicionando-se etanol, evaporando-se, e o



resíduo seco é novamente evaporado com n-hexano ou éter de petróleo para remover traços de etanol.

Dos métodos descritos na literatura, o mais largamente difundido no Brasil é o de Rodriguez et al. (1976a). Ele utiliza coluna aberta e a sua grande vantagem sobre o método da AOAC e COST 91 é a separação completa dos carotenóides, podendo ser usado para qualquer alimento, e o cálculo do valor de vitamina A pode ser feito observando-se as atividades pró-vitamínicas de cada carotenóide. Apesar do seu baixo custo e uso de aparelhagem simples, vem sendo procurado um método mais rápido para a determinação de pró-vitaminas A e/ou da composição completa de carotenóides.

Simpson et al. (1987), baseados no uso de fase reversa em CLAE, propuseram um método que utiliza coluna aberta de sílica gel ligada a hidrocarboneto de 18 carbonos. Apesar de utilizar solventes caros, tóxicos e saponificação drástica (KOH 60% aquoso adicionado ao pigmento seco), esse método apresenta algumas vantagens: 1-a coluna pode ser usada cerca de 100 vezes e 2-utiliza aparelhagem simples e, portanto, é mais barato que cromatografia líquida de alta eficiência, podendo ser aplicado em países em desenvolvimento. Os autores usaram o método para a análise de carotenóides pró-vitamínicos em espinafre, tomate, cenoura e pera.

A presença de cis isômeros em vegetais "in natura" pode acarretar erros na determinação do valor de vitamina A (Rao, 1967; Sweeney & Marsh, 1971b; Rouchaud et al., 1985; Chandler & Schwartz, 1987 e Rodriguez, 1988), já que esses isômeros que pos-

sua atividade de pró-vitamina A têm biopotência mais baixa que as formas trans (Zechmeister, 1962).

Rao (1967) encontrou os menores teores de cis isômeros de  $\beta$ -caroteno em folhas, enquanto Sweeney & Marsh (1971a e b), Rodriguez (1988) e Chandler & Schwartz (1987) relataram concentrações semelhantes. Já Rouchaud *et al.* (1985) e Quackenbush (1987) obtiveram maiores teores de neo  $\beta$ -caroteno B e menores de neo  $\beta$ -caroteno U que os autores acima. Nos trabalhos citados anteriormente, os valores de cis isômeros são fornecidos em porcentagens dos trans  $\beta$ -caroteno. Há ainda estudos, com CLAE, em que foi feita a separação dos cis isômeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, apesar destes não terem sido quantificados (Bushway, 1985 e 1986).

Atualmente, a técnica largamente destacada na determinação de carotenóides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), porém o alto custo do equipamento e a manutenção dispendiosa limita seu uso em países em desenvolvimento.

Baseado no binômio fase estacionária-fase móvel, os métodos em CLAE podem ser divididos em quatro tipos: 1-fase normal-eluição isocrática, 2-fase normal-eluição com gradiente de fase móvel, 3-fase reversa-eluição isocrática e 4-fase reversa-eluição com gradiente de fase reversa.

Bushway (1985), utilizando coluna de amina ou alumina e sistemas de fases móveis isocráticas, obteve resultados diversos pois na coluna de amina ocorreu separação de cinco cis isômeros e trans  $\beta$ -caroteno proveniente de  $\beta$ -caroteno irradiado, não ocorrendo separação entre padrões de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno. Já na coluna de

alumina houve separação entre padrões de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, mas os picos dos cis isômeros ficaram juntos, embora separados do trans  $\beta$ -caroteno, tanto para  $\beta$ -caroteno irradiado como para couve "in natura". A identificação foi baseada nos tempos de retenção dos padrões, e absorbâncias a 470 e 450 nm. Não foi feita quantificação.

Há vários trabalhos (Stewart, 1971 e 1977; Reeder & Park, 1975; Filksal, 1978) que utilizaram CLAE com fase normal e eluição com gradiente de fase móvel para separar misturas de carotenos e xantofilas, mas há poucos estudos com verduras folhosas.

Iriyama et al. (1978) separaram  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e clorofila a e b em espinafre. Os carotenóides não foram quantificados e a identificação feita somente com base no tempo de retenção e Rf na camada delgada.

Usando extrato saponificado de alface, Takagi (1985) separou e identificou  $\beta$ -caroteno, luteína, anteraxantina, violaxantina e neoxantina. Para a quantificação foi utilizada padronização externa com padrão de  $\beta$ -caroteno e fatores de correção baseados nas razões entre absortividades para os outros carotenóides.

Os dois trabalhos acima (Iriyama et al., 1978 e Takagi, 1985) utilizaram coluna de sílica gel para a análise de carotenóides totais. Apesar da boa separação obtida, a coluna de sílica gel pode levar à degradação dos carotenóides (Braumann & Grimme, 1981) e, por isso, atualmente seu uso tem diminuído.

Apesar de não ter sido reportado nenhum trabalho onde houve a separação de todos os carotenóides e de isômeros pró-vitâmnicos em uma única eluição pela coluna, o sistema fase reversa com eluição isocrática tem sido muito usado, especialmente com coluna de fase reversa C-18.

Bushway (1985) utilizando 4 colunas de marcas diferentes de fase reversa C-18 e 6 sistemas de eluentes isocráticos, obteve resultados surpreendentes pois em duas colunas onde ocorreu a melhor resolução entre padrões de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e cantaxantina, os isômeros de  $\beta$ -caroteno irradiado não foram separados. Já nas colunas onde houve separação de 4 a 5 isômeros de  $\beta$ -caroteno irradiado os padrões de carotenóides não ficaram bem resolvidos ou não foram separados. Apenas na coluna "Vydac 201TP54" com metanol:clorofórmio (9:1) como fase móvel, os resultados foram intermediários, isto é: os padrões e 4 isômeros de  $\beta$ -caroteno irradiado foram razoavelmente separados. Deve-se ressaltar que a mistura de padrões e o  $\beta$ -caroteno irradiado foram aplicados no cromatógrafo separadamente.

Utilizando couve "in natura", ocorreu a separação de  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno junto com neo  $\beta$ -caroteno B e neo  $\beta$ -caroteno U (cis isômeros) em coluna de fase reversa (C-18) com eluição isocrática. Não foi feita quantificação e a identificação baseou-se no tempo de retenção de padrões, espectros UV-visível e razão de absorbância a 470 e 450 nm (Bushway, 1985).

Num outro trabalho, Bushway (1986) também separou 2 cis isômeros e trans  $\beta$ -caroteno em espinafre, mas não quantificou os cis isômeros nem citou como foi feita a quantificação do trans  $\beta$ -caroteno.

A separação de 2 cis isômeros e trans  $\beta$ -caroteno em couve fresca e  $\beta$ -caroteno irradiado utilizando programação da fase móvel, e a separação de 2 cis isômeros e trans luteína em luteína irradiada com fase móvel isocrática foi obtida por Quackenbush (1987). Como a identificação dos cis isômeros foi baseada em outros estudos, o autor reconhece que a identidade desses isômeros pode estar trocada. A quantificação foi feita utilizando-se Sudan I como padrão interno, e o teor de cis isômeros foi dado em porcentagem.

Bureau & Bushway (1986) e Speek et al. (1986 e 1988) separaram apenas  $\beta$ -caroteno em diversas verduras folhosas. Nos 3 trabalhos, apesar dos padrões não terem sido purificados para a utilização na padronização externa, a curva de calibração foi verificada diariamente.

Khacik et al. (1986) utilizaram eluição isocrática para separar  $\beta$ -caroteno do decapreno  $\beta$ -caroteno que foi usado como padrão interno para a quantificação da fração contendo  $\beta$ -caroteno e seu 15, 15' cis isômero. Para a separação das xantofilas e  $\beta$ -apo-8'-carotenal (padrão interno para a quantificação das xantofilas) das clorofilas e carotenos foi usado uma combinação de eluição isocrática com gradiente de solvente. A identificação foi feita com base nos tempos de retenção dos padrões, espectros UV-

visível, espectrometria de massa e de ressonância magnética nuclear.

Utilizando programação da fase móvel e fase reversa, foi obtida a separação de  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina em espinafre, porém não foram quantificados (Eskins et al., 1977).

O sistema de gradiente de eluição-fase reversa tem sido evitado porque há o inconveniente do longo tempo de re-equilíbrio da coluna entre as análises (Zakaria et al., 1979 e Nelis & Leenherr, 1983).

Apesar da possibilidade da CLAE proporcionar melhores resoluções na determinação de carotenóides, este potencial ainda não foi aproveitado (Ruedi, 1985), pois não há resultados sobre a determinação completa dos carotenóides e nem das pró-vitaminas em alimentos. Além disso há necessidade ainda de padronização e definição dos procedimentos no que se refere a preparo de amostra, quantificação e identificação.

## 2.4. FATORES QUE INFLUEM NA COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM VERDURAS FOLHOSAS

Os fatores mais citados, na literatura, que influem na composição de carotenóides são: 1-cultivar, 2-condições climáticas, 3-efeitos geográficos, 4-estádio de maturação, 5-duração e condições de armazenamento e 6-cozimento ou processamento.

Apesar de já relatado na literatura que a composição de carotenóides, e consequentemente o valor de vitamina A pode variar devido às diferentes cultivares, praticamente não há estudos referentes a verduras folhosas.

Dito cultivares de cenoura foram estudados por Booth (1957), onde o número de amostras analisadas variou de 5 a 65 conforme a variedade, concluindo que não houve correlação entre a concentração de carotenos nas folhas e raízes. Também não houve diferença significativa entre as variedades e anos de colheita no teor de caroteno em folhas de cenoura.

Klein & Perry (1982) reportaram diferença significativa no valor de vitamina A em folhas de aipo e repolho provenientes de diferentes áreas geográficas. Nos diferentes períodos (março e novembro) em que analisou-se repolho, não houve diferença significativa nos valores de vitamina A. Já as folhas de aipo apresentaram maior teor de caroteno em junho do que em dezembro. Foi analisada apenas uma amostra em duplicata ou triplicata para cada

período e área geográfica.

Em folhas de azaléia e de "spindle tree", Takagi (1985) encontrou que a razão luteína/ $\beta$ -caroteno era maior no inverno que no verão. Não foi feita análise estatística e o autor não relatou o número de amostras analisadas.

Após determinação de carotenóides em vegetais, frutas e verduras folhosas, Bureau & Bushway (1986) observaram que não houve diferença significativa tanto entre locais como entre os meses onde foram feitas as coletas de amostras. O número de amostras para cada alimento variou de 1 a 9.

Analisando uma amostra em duplicata de cada verdura, Penteado et al. (1986) relataram maiores valores de vitamina A em hortaliças folhosas consumidas no norte do Brasil, no período onde houve maior índice pluviométrico do que no período de seca. Farrow et al. (1979) também encontraram variações no teor do valor de vitamina A em espinafre enlatado durante os anos de 1972 a 1976, e embora a variabilidade não tenha sido excessiva, as flutuações sazonais foram importantes.

Rouchaud et al. (1985) também não encontraram diferença significativa entre o conteúdo de cis  $\beta$ -caroteno e trans  $\beta$ -caroteno em alfaces colhidas em maio e agosto (verão). O mesmo foi observado para as xantofilas monoidroxiladas, embora o conteúdo total de xantofilas foi, de um modo geral, maior para as alfaces de verão do que as de maio, independente do agrotóxico utilizado. Já os teores de carotenóides totais das alfaces tratadas com 2 herbicidas (propyzamida e chlorpropham) e com 1 fungicida (ipro-



dione) foram mais altos que o controle. O tratamento com benomyl e vinclozolina não mudou significativamente os teores de  $\beta$ -caroteno e xantofilas, enquanto que quando aplicou-se vinclozolina ocorreu um decréscimo no conteúdo de xantofilas. Neste estudo foram feitas 4 replicações para cada tratamento.

Os pesos dos pés de alfaces tratados com uma mistura de herbicidas (propyzamida e chlorpropham) ou com fungicida (iprodione) foram maiores que os dos controle, enquanto que o tratamento com os outros pesticidas (benomyl e vinclozolina) não afetou os pesos. A concentração de  $\beta$ -caroteno foi menor nas alfaces que sofreram tratamento com os pesticidas estudados. Os teores de  $\beta$ -criptoxantina, luteína, violaxantina e neoxantina também aumentaram com os tratamentos por propyzamida, chlorpropham e iprodione (Rouchaud et al., 1984).

Sweeney & Marsh (1971a) observaram que os herbicidas não causaram mudanças significativas na razão entre cis e trans isômeros de  $\beta$ -caroteno em espinafre. O espinafre variedade Bounty, que foi tratado com os herbicidas CDEC e endothal teve um teor de  $\beta$ -caroteno total mais baixo que o controle, entretanto na variedade 668.9 os valores de  $\beta$ -caroteno obtidos no tratamento com os herbicidas e controle não diferiram.

O estágio de maturação, em alface e chicória, foi estudado por Ramos & Rodriguez-Amaya (1987) que observaram que as folhas maduras tiveram teores de  $\beta$ -caroteno, luteína e valor de vitamina A cerca de 3 vezes maiores que as folhas jovens. Por outro lado, em espinafre o teor de  $\beta$ -caroteno diminuiu com o aumento da

maturidade do vegetal (Sweeney & Marsh, 1971a).

Rodriguez (1988) observou perdas significativas de cerca de 7% de  $\beta$ -caroteno, e conseqüentemente do valor de vitamina A, em verduras folhosas submetidas ao branqueamento. Já Sweeney & Marsh (1971a) relataram diminuição de 15 a 20% no valor de vitamina A quando couve, espinafre e almeirão sofreram cozimento e/ou congelamento. Dados equivalentes foram obtidos por Chandler & Schwartz (1987) e Speek et al. (1988).

Khacik et al. (1986) constataram que embora o teor de  $\beta$ -caroteno não tenha sofrido alteração durante o cozimento de couve, houve perdas substanciais de xantofilas. Tan & Francis (1962) observaram o mesmo comportamento dos carotenóides em espinafre enlatado.

Aumentos no conteúdo de  $\beta$ -caroteno, na faixa de 24 a 88%, foram observados por Gomez (1981) em folha de mandioca, couve e espinafre africano quando sofreram cozimento por 15 minutos em água fervente.

O  $\beta$ -caroteno foi o carotenóide que teve a menor taxa de decomposição (11%) em espinafre estocado em saco de polietileno a  $-10^{\circ}\text{C}$  por 30 dias, enquanto zeaxantina apresentou o maior grau de decomposição (Hirayama & Oido, 1969). A estocagem entre 0 e  $10^{\circ}\text{C}$  também causou perdas de  $\beta$ -caroteno de 23,7% em espinafre e 9,2% em folhas de Colocasia (Rao, 1967).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

As duas cultivares de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) manteiga e tronchuda portuguesa, e as verduras nativas: beldroega (*Portulaca oleracea* L.), caruru (*Amaranthus viridis* L.), mentruz (*Lepidium pseudodidymum* Thell.), serralha (*Sonchus oleraceus* L.) e taioba (*Colocasia esculenta* L.) foram obtidas de uma horta que não utiliza insumos agrícolas, no município de Campinas. A couve manteiga foi obtida também em outra horta, localizada no município de Campinas, que utiliza herbicida (gliphosate), inseticida (rodia tox) e adubo folhar (nitrogênio, fósforo e potássio).

O aspecto das verduras folhosas nativas analisadas neste trabalho está apresentado nos Anexos I, II, III, IV e V.

#### 3.2. MÉTODO DE RODRIGUEZ et al. (1976a)

Como os carotenóides são pigmentos susceptíveis à ação da luz, todas as operações foram realizadas com as luzes apagadas e os pigmentos protegidos com o auxílio de papel alumínio. As análises foram iniciadas no mesmo dia da colheita.

Para adaptar o método aos vegetais em estudo algumas modificações foram introduzidas: 1-retirada da etapa de saponificação, 2-uso de outras proporções da fase móvel na eluição dos carotenóides da coluna e 3-submersão das verduras folhosas em acetona antes da extração.

### 3.2.1. EXTRAÇÃO

Partindo de um maço comercial de couve pesando cerca de 180 g e de maços comerciais de verduras nativas cujos pesos variaram de 200 a 400 g dependendo da verdura, selecionou-se folhas maduras, do mesmo tamanho e coloração. As verduras folhosas foram picadas manualmente, pesadas (5 g) e deixadas de molho em acetona fria (10 minutos). A extração foi feita triturando-se a amostra em um liquidificador com acetona resfriada e cerca de 6 g de hiflosupercel, seguida de filtração em funil de Buchner sob vácuo. A extração e filtração foram repetidas até o resíduo se tornar incolor (2 vezes).

Os pigmentos dissolvidos em acetona foram transferidos para éter de petróleo, em um funil de separação, adicionando-se pequenas porções da solução pigmento-acetona, seguida de água

destilada, e descartando a camada inferior (água-acetona) após a separação das duas fases. Quando todos os pigmentos se encontravam no éter, foram feitas mais cinco lavagens com água para assegurar a retirada total de acetona. Sulfato de sódio anidro foi adicionado à solução para retirada da água residual.

### 3.2.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA

A solução de pigmentos foi concentrada em roto-vapor (marca Buchner) até o menor volume possível (3 ml), não ultrapassando a temperatura de 35°C para evitar a degradação dos carotenóides. Para a separação dos carotenóides utilizou-se uma coluna de vidro, de 2,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de altura, empacotada à vácuo com hiflosupercel (Johns-Manville):MgO (Merck) (2:1) até a altura de 10,0 cm. Uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro foi adicionada no topo da coluna para reter possíveis gotas de água ainda presentes na amostra. A coluna foi molhada com éter de petróleo e após aplicação da amostra, foi desenvolvida por concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (10 e 12%: para eluição do  $\beta$ -caroteno; 14 e 16%: para eluir  $\alpha$ -criptoxantina; 20 e 24%: até eluir luteína; 28%: para eluir zeaxantina, e 60 e 80% (v/v) até eluição da violaxantina).

Para a análise de carotenóides pró-vitamínicos em verduras folhosas, utilizou-se a coluna descrita acima e como eluente 10 e 12% de acetona em éter de petróleo.

As frações eluídas da coluna que continham acetona foram transferidas para éter de petróleo em um funil de separação, onde adicionou-se éter de petróleo, pequenas porções de extrato acetônico, e depois uma quantidade de água suficiente para haver a transferência dos pigmentos para a fase etérea. A fase aquosa inferior foi descartada e o processo foi repetido até a transferência completa dos pigmentos. A fase etérea foi lavada com água (3 a 4 vezes) até a remoção total da acetona. Adicionou-se sulfato de sódio anidro para remover a água remanescente e as frações foram concentradas ou diluídas, conforme o necessário, até volume conhecido.

### 3.2.3. IDENTIFICAÇÃO

Para a identificação dos carotenóides foram avaliados conjuntamente os seguintes parâmetros: 1-ordem de eluição na coluna, 2-espectros de absorção na região do visível, 3-valores de  $R_f$  na camada de sílica gel e 4-reações químicas específicas.

Os espectros de absorção dos carotenóides foram registrados na faixa de comprimento de onda de 350 a 550 nm em espectrofotômetro de feixe duplo da Unicam, modelo SP 8000, acoplado com registrador. Os carotenóides apresentam 3 máximos de absorção, em comprimentos de onda característicos de suas estruturas, que foram comparados, então, com valores tabelados para vários carotenóides (Davies, 1976).

Os carotenóides isolados, após concentração, foram aplicados em camada delgada de sílica gel com 0,25 mm de espessura, previamente ativadas a 110°C por duas horas. Utilizando 3 % de metanol em benzeno como fase móvel, os carotenos eluíram com a frente de solvente, enquanto que as xantofilas foram retidas na fase estacionária em menor ou maior grau, dependendo de seus grupos funcionais. Foi usado também como fase móvel 30% de acetona em éter de petróleo (Gross, 1980) para verificar a presença ou não de neoxantina (epóxi xantofila triidroxilada), já que neste caso as xantofilas e epóxidos diidroxilados têm Rfs muito distintos do epóxido triidroxilado.

Algumas reações químicas foram utilizadas para confirmar a identidade e posição dos substituintes. Verificou-se a existência de epóxidos pela mudança de coloração das manchas de amarelo ou laranja para azul ou verde, expondo a placa de sílica gel, após desenvolvimento, a vapores de HCL (Gross et al., 1971). A presença de um ou dois grupos 5,6 epóxidos foi detectada pela diminuição no comprimento de onda de 20 a 40 nm, respectivamente, após adição de HCL 0,1 N à solução etanólica do pigmento, devido à transformação do 5,6 epóxido em 5,8 epóxido.

Para verificar a forma de configuração cis ou trans, foram adicionadas algumas gotas de solução etérea de iodo ao pigmento em éter de petróleo para catalisar a fotoisomerização. O espectro registrado após 5 minutos de exposição à luz mostrou, no caso de carotenóides originalmente trans, um deslocamento para comprimentos de onda mais baixos devido à isomerização para a

forma cis (efeito hipsocrômico). Já com cis carotenóides verificou-se pequeno efeito batocrômico (Davies, 1976).

Utilizou-se a reação de acetilação para constatar a presença de hidroxilas secundárias, que consistiu em adicionar 0,2 ml de anidrido acético ao pigmento dissolvido em 2,0 ml de piridina, deixando a reação desenvolver-se por 21 horas no escuro à temperatura ambiente. O pigmento foi então transferido para éter de petróleo e novamente submetido à cromatografia em camada delgada. A reação é positiva quando ocorre um aumento no valor de Rf em relação ao valor obtido antes da reação.

A presença de hidroxilas alílicas em posição isolada ou conjugada, foi confirmada por metilação. Adicionou-se HCL 0,1 N ao pigmento dissolvido em metanol e após 3 horas no escuro à temperatura ambiente, o pigmento foi transferido para éter de petróleo e recromatografado em camada delgada. A reação positiva caracteriza-se por um aumento no valor de Rf.

#### 3.2.4. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

A quantificação de cada pigmento foi feita a partir da absorbância máxima, aplicando a lei de Beer. Os valores das absortividades foram obtidos da tabela apresentada por Davies (1976).



A absorptividade da luteína e violaxantina foi calculada segundo a fórmula apresentada por Davies (1976), e os valores utilizados foram 2600 e 2300, respectivamente.

### 3.2.5. CÁLCULO DO VALOR DE VITAMINA A

O cálculo do valor de vitamina A foi feito a partir da atividade provitamínica de cada carotenóide precursor, tabelado por Bauernfeind (1972). Nas verduras folhosas, os carotenóides que possuem valor de vitamina A são:  $\beta$ -caroteno (atividade 100%) e  $\alpha$ -criptoxantina (atividade 50%). Pelo NAS-NRC (1980), 1 retinol equivalente (RE) corresponde a 6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno e 12  $\mu$ g de  $\alpha$ -criptoxantina.

## 3.3. MÉTODO DE SIMPSON et al. (1987)

### 3.3.1. EXTRAÇÃO

Utilizou-se 2,5 g das verduras folhosas picadas manualmente e a extração foi feita triturando-se a amostra em um liquidificador com acetona em ambiente de nitrogênio. O extrato foi filtrado em funil de Buchner, sob vácuo e o processo repetido até o resíduo se tornar incolor.

O extrato de acetona foi então adicionado a um igual volume de éter de petróleo em um funil de separação. Adicionou-se uma pequena porção de água e a fase aquosa (inferior) foi re-extraída uma vez com éter de petróleo. As fases superiores foram juntadas e lavadas três vezes com água destilada para a remoção da acetona.

### 3.3.2. SAPONIFICAÇÃO

Após evaporação até secura em roto-evaporador, adicionou-se uma solução de KOH 60% (p/v) aquoso (cerca de 25 ml) ao pigmento seco. A solução foi deixada no escuro por uma noite à temperatura ambiente. Após a saponificação, os pigmentos foram transferidos para éter de petróleo e lavados com água num funil de separação até a total eliminação do álcali. Adicionou-se então sulfato de sódio anidro à solução para a retirada da água residual.

Neste caso, a saponificação foi feita principalmente para retirar a clorofila.

### 3.3.3. CROMATOGRAFIA EM COLUNA, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A solução de carotenóides foi mais uma vez seca com o auxílio de um evaporador rotatório. Os pigmentos foram dissolvidos em um pequeno volume de acetonitrila-clorofórmio (92:8 v/v), aplicada em uma coluna previamente molhada com acetonitrila e eluída com acetonitrila-metanol-clorofórmio (47:47:6 v/v/v) sob vácuo. A coluna de 1,0 cm de diâmetro e 18,0 cm de altura foi empacotada à vácuo com fase de C-18 quimicamente ligada à sílica (Separations Technology, EUA) de 50  $\mu$ m até uma altura de 7,0 cm. Após eluição dos carotenóides, o adsorvente sofreu uma limpeza na própria coluna pela passagem de tetraidrofurano e acetonitrila, separadamente. Depois de seca sob vácuo, o topo da coluna foi coberto e o adsorvente pode ser usado novamente.

As frações foram transferidas para éter de petróleo, após sucessivas lavagens com água para a retirada de acetonitrila e metanol. O clorofórmio remanescente não interfere no coeficiente de extinção dos carotenóides.

A identificação e quantificação dos carotenóides foi feita de acordo com os itens 3.2.3, 3.2.4 e 3.2.5.

Para verificar se os carotenóides eluídos da coluna estavam puros ou não, as frações foram concentradas e aplicadas em camada delgada de sílica gel 0,25 mm, ativada a 110°C/ 24 h e desenvolvida com 3% de metanol em benzeno (Rodriguez et al., 1976a).

### 3.4. MÉTODO DE FASE REVERSA MODIFICADO

#### 3.4.1. EXTRAÇÃO

Utilizou-se 2,5 g de amostra na extração, que foi baseada no método de Rodriguez et al. (1976a) já descrito anteriormente. As modificações introduzidas foram: 1-retirada da etapa de saponificação, que além de evitar a degradação dos carotenóides diminui o tempo de análise em cerca de 12 horas e 2-o uso de uma menor quantidade de amostra, 3-a adição de 0,25 g de carbonato de magnésio por grama de amostra à verdura imersa em acetona para evitar a formação de feofitina, que interfere na quantificação.

Os carotenóides foram transferidos para éter de petróleo como descrito na seção 3.2.1.

#### 3.4.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A solução etérea de pigmentos foi concentrada em rotovapor até a secagem, dissolvida em pequeno volume de 15% de água em acetona e aplicada na coluna. Utilizou-se uma coluna de 1,0 cm de diâmetro e 18,0 cm de altura, empacotada sob vácuo com fase reversa C-18 (50  $\mu$ m) até a altura de 7,0 cm. A coluna foi previamente molhada com 15% de água em acetona e os carotenóides foram eluídos com concentrações decrescentes de água em acetona ( 15,

10 e 0%), sob vácuo. Após eluição dos carotenóides, seguiu-se uma limpeza da coluna com 20 ml de metanol e 20 ml de éter de petróleo separadamente. A coluna foi completamente seca e guardada para ser utilizada novamente.

Como não há na literatura coeficiente de extinção em acetona para  $\beta$ -caroteno, as frações foram transferidas para éter de petróleo, e lavadas com água até a total retirada da acetona. Adicionou-se sulfato de sódio anidro para a retirada da água residual.

A identificação e quantificação foram efetuadas seguindo os itens 3.2.3, 3.2.4 e 3.2.5.

### 3.5. ANÁLISE DE OUTROS VEGETAIS E FRUTAS

Além de couve, usou-se espinafre, abóbora, tomate e mamão vermelho que possuem composição de carotenóides distintas, para verificar a versatilidade do método de FR modificado e de Simpson et al. (1987)

Para a análise de frutas, em que os carotenóides hidroxilados encontram-se esterificados com ácidos graxos, foi necessário o uso de saponificação. Utilizou-se a saponificação descrita por Rodriguez et al. (1976a), que consistiu em adicionar uma solução de KOH 10% (p/v) em metanol, em igual volume, à solução etérea de pigmentos. A solução permaneceu por uma noite no escuro

à temperatura ambiente. Após a saponificação, os pigmentos foram lavados com água até a total eliminação do álcali. Adicionou-se então sulfato de sódio anidro para a retirada da água residual.

As etapas de cromatografia em coluna e identificação foram executadas de acordo com os itens descritos anteriormente.

### 3.6. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE BETA-CAROTENO

O padrão de  $\beta$ -caroteno (Hoffman La-Roche) foi purificado em coluna aberta de MgO (Merck ou Riedel) e hiflosupercel comercial (1:1) com éter de petróleo como eluente, para a retirada de epóxidos de  $\beta$ -caroteno. Para a retirada dos cis isômeros, utilizou-se uma coluna de hidróxido de cálcio (Mallinckrodt) e éter de petróleo como eluente.

Adicionou-se o padrão de  $\beta$ -caroteno, previamente purificado, ao extrato de couve em acetona para verificar a porcentagem de recuperação de  $\beta$ -caroteno nos três métodos descritos acima (itens 3.2.1, 3.2.2, 3.2.4; 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3; 3.4.1 e 3.4.2).

Na verificação da porcentagem de recuperação de  $\beta$ -caroteno nas colunas de MgO:hiflosupercel e de fase reversa C-18, eluiu-se o padrão de  $\beta$ -caroteno purificado segundo os métodos de Rodriguez et al. (item 3.2.2), de Simpson et al. (item 3.3.3) e do modificado (item 3.4.2).

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as comparações entre os diversos fatores e os métodos foi utilizado o programa SAS (Statistical Analysis System).

O teste de Scheffe foi usado para verificar a ocorrência ou não de diferença significativa entre os cultivares, época de colheita e tipo de horta. Para verificar diferença entre os métodos, utilizou-se o teste de múltipla escolha de Duncan.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS QUE UTILIZAM COLUNA ABERTA DE FASE NORMAL E REVERSA

Devido aos resultados conflitantes e à necessidade de métodos mais rápidos e ao mesmo tempo mais precisos e exatos, há uma tentativa de aprimorar os métodos, principalmente pela introdução de técnicas mais modernas.

Como alternativa para CLAE, que ainda é uma técnica muito dispendiosa para países em desenvolvimento, a utilização de fase reversa C-18 preparativa em coluna aberta foi introduzida por Simpson et al. (1987).

No presente trabalho o método de Simpson et al. foi modificado para evitar o uso de solventes tóxicos e caros (acetonitrila e tetraidrofurano) e retirar a etapa de saponificação, tornando-o mais rápido. Além disso foi realizada uma comparação desses métodos com o de Rodriguez et al. (1976a), que vem sendo utilizado no laboratório por vários anos.

#### 4.1.1. RECUPERAÇÃO DE BETA-CAROTENO PADRÃO



Apesar do uso de diferentes fases estacionárias e móveis, a porcentagem de recuperação de  $\beta$ -caroteno padrão da coluna foi igual (98%) para os métodos de Rodriguez et al. (1976a) e para o de fase reversa modificado. Já o método de Simpson et al. (1987) apresentou a menor recuperação (96%), pois o sistema de solvente utilizado não foi capaz de eluir totalmente o  $\beta$ -caroteno da coluna (Tabela 2).

Sweeney & Marsh (1970) obtiveram 98% de recuperação de  $\beta$ -caroteno em coluna de MgO:hiflosupercel (1:2), eluído com 5% de acetona em éter de petróleo. Esse resultado foi igual ao obtido neste trabalho para o método de Rodriguez et al. (1976a), que também utiliza coluna de MgO:hiflosupercel (1:2) e a eluição do  $\beta$ -caroteno foi feita com 10% de acetona em éter de petróleo.

Em coluna de açúcar ativado e amido de milho (7:3), Tan & Francis (1962) obtiveram 95,5% e 83,0% de recuperação de  $\beta$ -caroteno e luteína, respectivamente.

As porcentagens de recuperação para os três métodos avaliados no presente trabalho foram de: 92% para o método de Rodriguez et al. simplificado (item 3.2) e para o de fase reversa modificado (item 3.4), e 89% para o método de Simpson et al. (item 3.3) (Tabela 2). A menor porcentagem de recuperação de  $\beta$ -caroteno no método de Simpson pode ser devido à não eluição completa do  $\beta$ -caroteno da coluna, já discutido anteriormente, e

TABELA 2: Recuperação de beta-caroteno.

| MÉTODOS                       | RECUPERAÇÃO NA COLUNA <sup>1</sup> |         | RECUPERAÇÃO DO MÉTODO <sup>1</sup>    |            |         |
|-------------------------------|------------------------------------|---------|---------------------------------------|------------|---------|
|                               | Concentração                       | % Recu- | Conc. de $\beta$ -caroteno ( $\mu$ g) |            | % Recu- |
|                               | de padrão ( $\mu$ g)               | peração | em couve                              | adicionado | peração |
| Rodriguez et al. <sup>2</sup> | 318,29                             | 98      | 37,62                                 | 239,20     | 92      |
| Simpson et al. <sup>3</sup>   | 321,18                             | 96      | 89,70                                 | 122,01     | 89      |
| FR modificado <sup>4</sup>    | 317,32                             | 98      | 145,16                                | 121,53     | 92      |

1: Médias de determinações em duplicatas

2: Fase estacionária- hiflosupercel:MgO (2:1)

Fase móvel- 10% acetona em éter de petróleo

3: Fase estacionária- fase reversa C-18

Fase móvel- acetonitrila:metanol:clorofórmio (47:47:6)

4: Fase estacionária- fase reversa C-18

Fase móvel- concentrações decrescentes de água em acetona (15, 10 e 0%)

às etapas de saponificação ( pois os carotenos possuem baixíssima solubilidade em soluções aquosas), partição adicional para éter de petróleo e secagem completa dos pigmentos que não fazem parte dos outros dois métodos e que podem acarretar perda de carotenóides. Comparando os resultados de perda na coluna e no método, as etapas adicionais acarretaram uma perda de somente 1% no teor de  $\beta$ -caroteno.

A recuperação do método COST 91 (Brubacker et al., 1985) não foi feita, já que os autores consideraram que o isolamento dos carotenos dos tecidos vegetais (células) não é comparável analiticamente com a separação de  $\beta$ -caroteno adicionado.

Recuperações geralmente maiores foram relatadas para métodos utilizando CLAE com fase reversa C-18. Bushway & Wilson (1982) obtiveram 100,5% de recuperação de  $\beta$ -caroteno adicionado à cenoura. De  $\beta$ -caroteno adicionado à tomate e abricó desidratado, Hsieh & Karel (1983) conseguiram 91 e 99% de recuperação, respectivamente. Speek et al. (1986) relataram 98% de recuperação para 7  $\mu\text{g/g}$  e 100% para 9  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno adicionado à espinafre, apesar das etapas rigorosas seguidas antes da cromatografia, inclusive saponificação com refluxo. No entanto, utilizando este método, os teores de  $\beta$ -caroteno de diversos alimentos obtidos por Speek et al. (1988) foram bem inferiores àqueles obtidos por outros autores.

#### 4.1.2. COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PRÓ-VITAMINA A EM VERDURAS FOLHOSAS

Não houve diferença significativa nos teores de  $\beta$ -caroteno obtidos em couve e espinafre pelos métodos de Rodriguez et al. (1976a) e de fase reversa modificado. Já os teores obtidos pelo método de Simpson et al. (1987) foram significativamente menores, a um nível de 5% (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos de  $\beta$ -caroteno padrão.

A separação de  $\beta$ -caroteno e as cores das frações visualizadas durante a análise das verduras folhosas nos três métodos está apresentada na Figura 2. O carotenóide  $\alpha$ -criptoxantina, que possui 50% de atividade de vitamina A, foi detectado em traços somente no método de Rodriguez et al. (1976a), já que nos métodos de Simpson et al. (1987) e de fase reversa modificado, a quantidade de amostra usada não foi suficiente para acusar a presença desse carotenóide.

Na coluna de fase normal (MgO e hiflosupercel) houve uma boa separação com pequeno alargamento de banda. Já na coluna de fase reversa, tanto no método de Simpson et al. (1987) como no modificado, houve um maior alargamento das bandas, embora este fato não tenha prejudicado a separação do  $\beta$ -caroteno dos demais carotenóides.

O tempo e custo gastos em uma análise de pró-vitaminas A em verduras folhosas foi de 2 horas e 0,42 OTN, 18 horas e 0,61

TABELA 3: Comparação entre métodos para a determinação de pró-vitamina A em verduras folhosas

| MÉTODOS          | CONCENTRAÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |                     |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                  | couve                                                              | espinafre           |
| Rodriguez et al. | 45,1121 $\pm$ 0,00a                                                | 31,0158 $\pm$ 0,27a |
| Simpson et al.   | 43,2716 $\pm$ 0,90b                                                | 27,4299 $\pm$ 0,89b |
| FR modificado    | 44,8380 $\pm$ 0,17a                                                | 30,4346 $\pm$ 0,17a |

1: Médias e desvios padrão de determinações em triplicatas.

Valores com letras diferentes diferem significativamente a um nível de 5%.

FR: Fase reversa

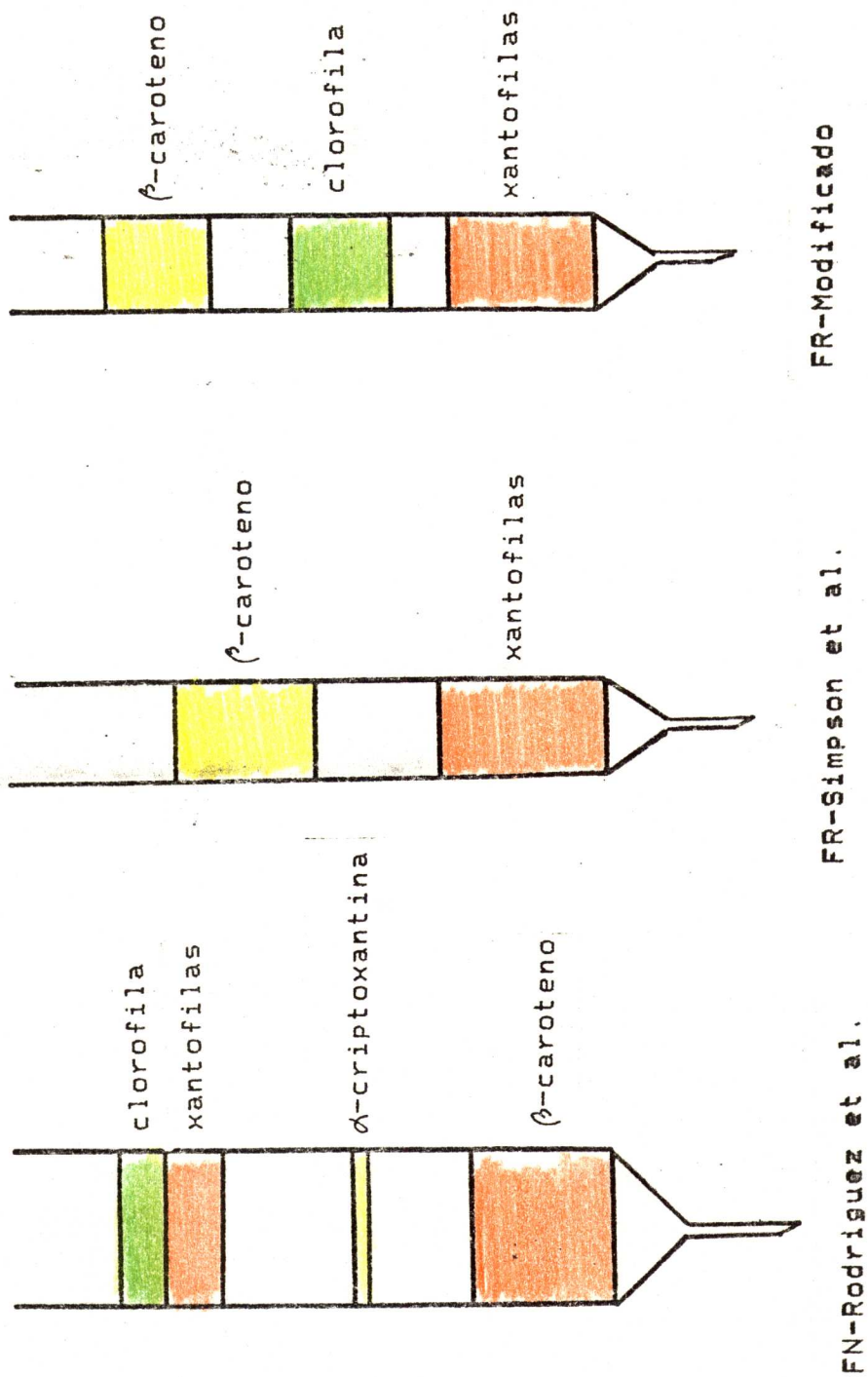


FIGURA 2 Separação de pró-vitaminas A em verduras folhosas por três métodos.

OTN, e 1 hora 24 minutos e 0,18 OTN para os métodos de Rodriguez et al., de Simpson et al. e de fase reversa modificado, respectivamente. Cabe lembrar que apesar do altíssimo custo da fase reversa, a coluna pode ser re-utilizada cerca de 100 vezes, diminuindo assim o custo da análise.

Deve-se ressaltar, no entanto, que a coluna de fase normal (Rodriguez et al., 1976a) é capaz de separar também as xantofilas entre si, permitindo a determinação da composição completa de carotenóides, tal separação não é possível nos métodos que usam coluna de fase reversa, limitando seu uso apenas para a determinação de pró-vitamina A.

#### 4.1.3. ANÁLISE QUALITATIVA DE OUTROS VEGETAIS E FRUTAS

Para avaliar a aplicabilidade dos métodos em amostras que contenham mais de uma pró-vitamina A, foram analisadas qualitativamente abóbora, tomate e mamão vermelho. As separações cromatográficas dos pigmentos estão apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5, mostrando inclusive as cores visualizadas na coluna cromatográfica.

Em abóbora, que possui  $\alpha$ -caroteno além de  $\beta$ -caroteno, os três métodos demonstraram uma separação dessas duas pró-vitaminas A (Figura 3). No entanto, para alimentos que contém licopeno como tomate, somente o método de Rodriguez et al. (1976a) pode ser usado porque nos dois métodos que utilizam fase reversa,

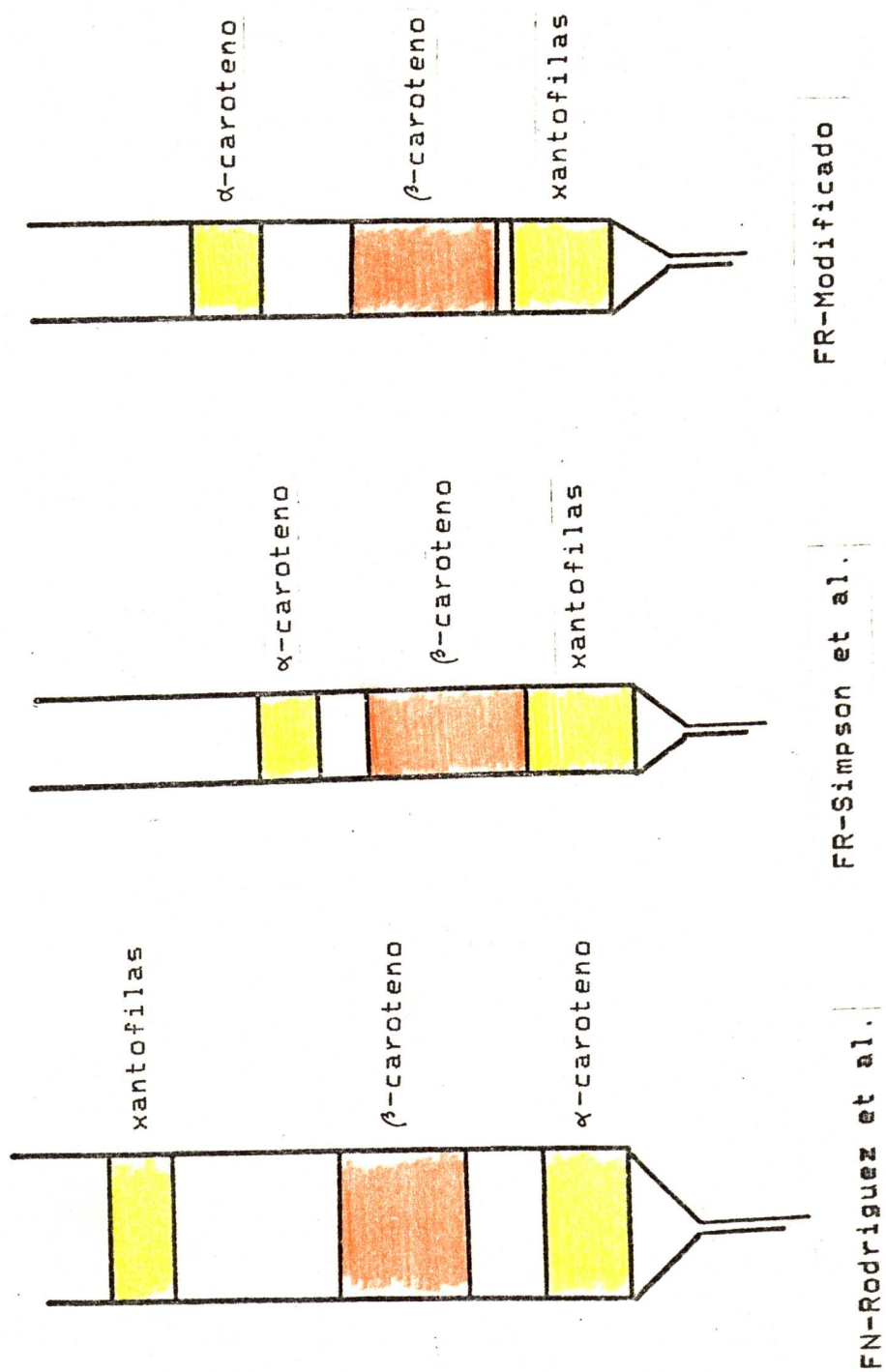


FIGURA 3: Separação de pró-vitaminas A em abóbora cultivar meni-  
na verde por três métodos



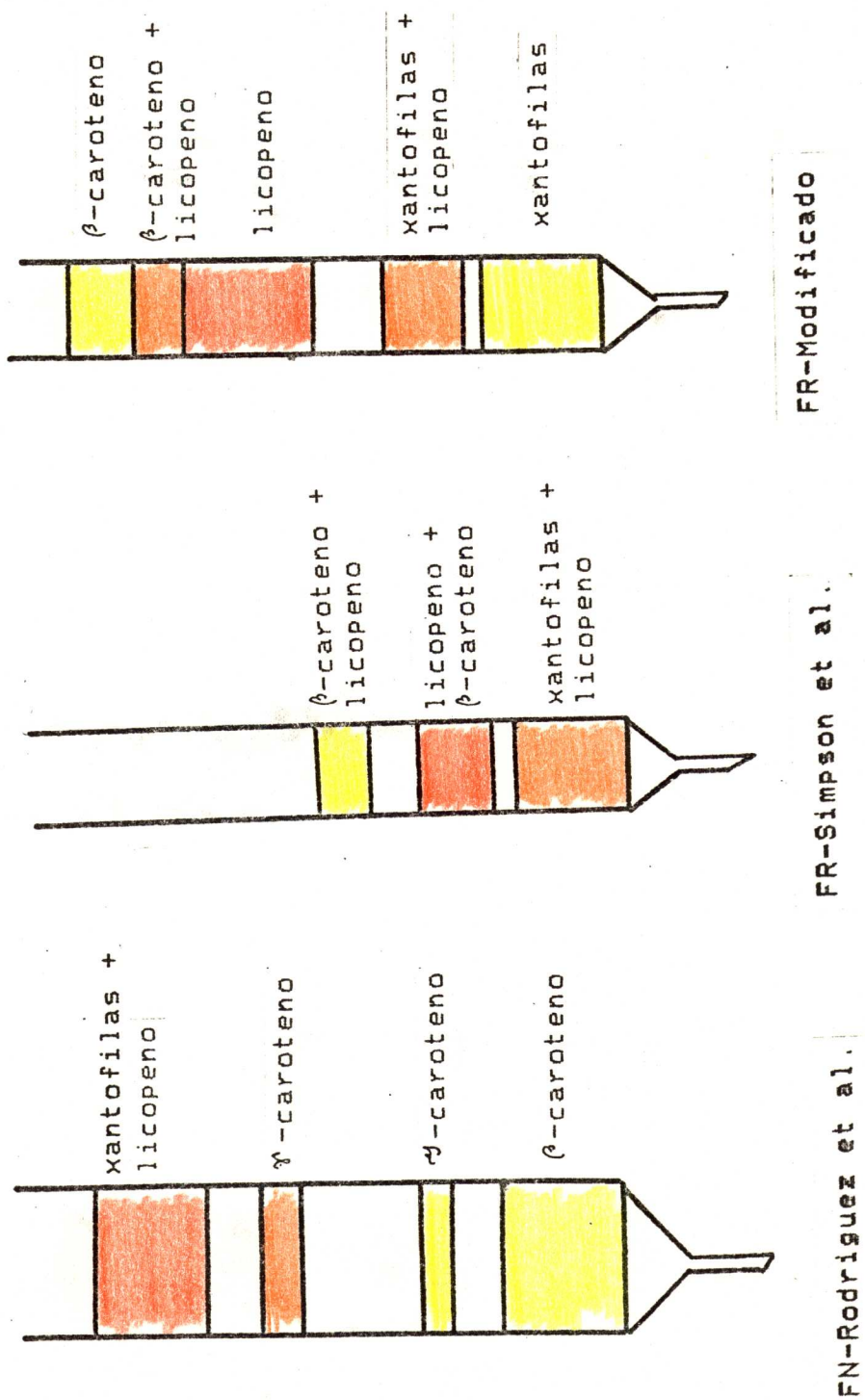


FIGURA 4: Separação de pró-vitaminas A em tomate por três métodos.

o licopeno espalha-se na coluna, misturando-se com as pró-vitaminas A (Figura 4). Em mamão vermelho, que também contém licopeno, houve separação entre duas pró-vitaminas A ( $\beta$ -caroteno e criptoxantina) nos métodos de Rodriguez et al. (1976a) e de FR modificado, mas o licopeno também espalhou-se na coluna de fase reversa misturando-se com o  $\beta$ -caroteno. Não ocorreu separação entre as duas pró-vitaminas no método de Simpson et al. (1987) (Figura 5).

Sendo mais versátil e permitindo ainda a determinação da composição completa de carotenóides, o método de Rodriguez et al. (1976), já bem padronizado no nosso laboratório, continuou a ser utilizado para os demais estudos que fazem parte desta tese.

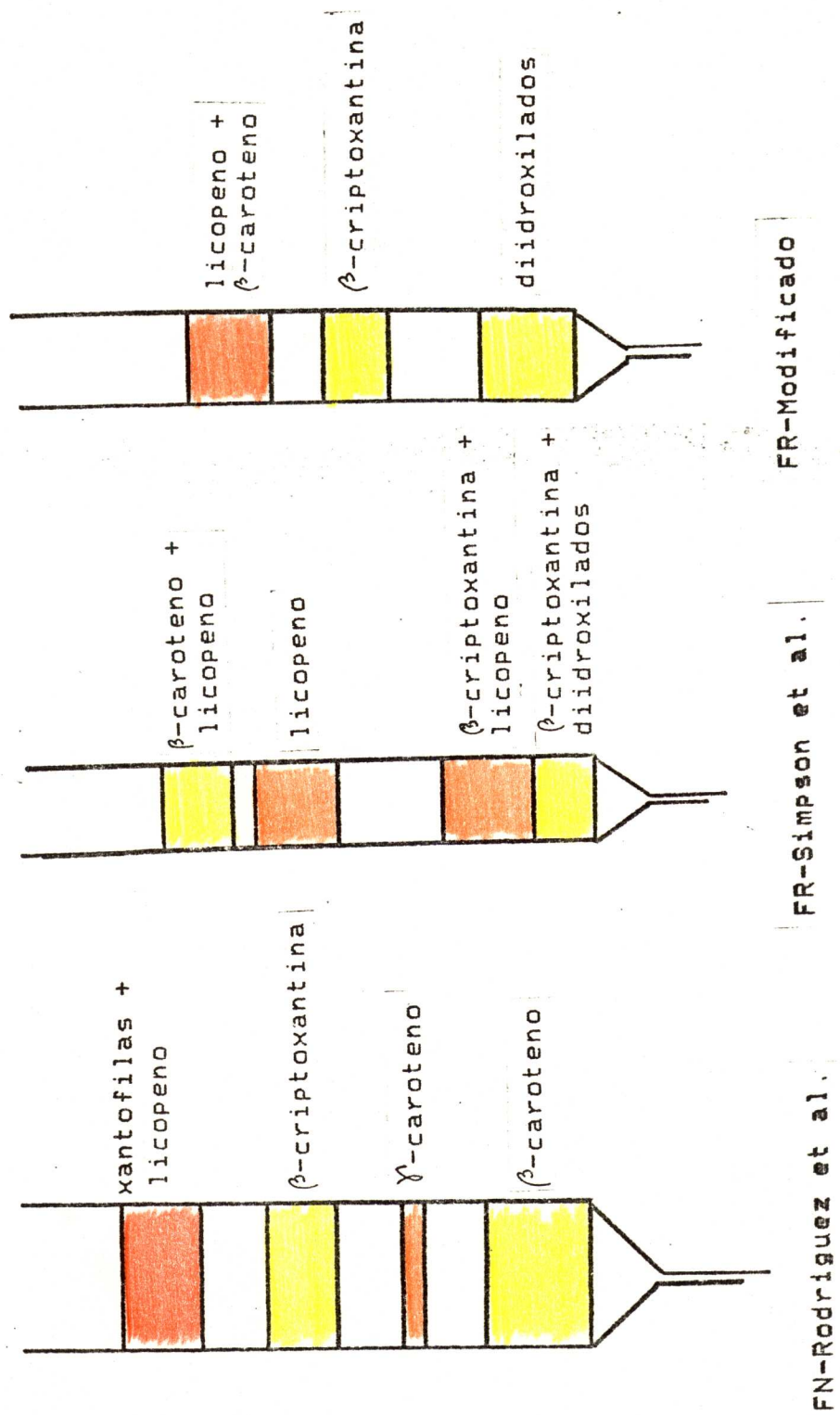


FIGURA 5: Separação de pró-vitaminas A em mamão vermelho por três métodos.

#### 4.2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DE CAROTENÓIDES EM VERDURAS FOLHOSAS VERDES

As duas cultivares de couve e as cinco verduras folhosas nativas avaliadas nesta tese apresentaram a mesma composição qualitativa de carotenóides. Foram detectados 6 carotenóides, cujas características estão resumidas na Tabela 4, e as estruturas apresentadas na Figura 6.

A Figura 7 mostra a separação típica dos 5 carotenóides na coluna de hiflosupercel e óxido de magnésio. A separação dos carotenóides em camada delgada de sílica gel, desenvolvida por 3% de metanol em benzeno e 30% de acetona em éter de petróleo está apresentada nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

O carotenóide neoxantina não aparece na coluna porque está em pequena quantidade, e só foi detectado em camada delgada (Figura 9) quando usou-se 4 vezes (20g) a quantidade de amostra normalmente usada para a cromatografia em coluna (5g).

A fração 1, de coloração laranja na coluna e na camada delgada, correu junto com a frente de solvente nos dois sistemas de solvente utilizados na CCD, demonstrando a ausência de substituintes polares. Quando exposta a vapores de HCl, não houve mudança de cor. Pelo seu espectro de absorção característico (Figu-

TABELA 4: Características dos carotenóides presentes em verduras folhosas verdes.

| FRAÇÃO <sup>1</sup> | IDENTIFICAÇÃO <sup>2</sup> | MÁXIMOS DE ABSORÇÃO <sup>3</sup><br>EM ÉTER DE PETRÓLEO | Rf EM CAMADA DELGADA <sup>4</sup> |      | REAÇÕES QUÍMICAS                                     |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|------------------------------------------------------|
|                     |                            |                                                         | A                                 | B    |                                                      |
| 1                   | $\beta$ -caroteno          | 476, 448, (424)                                         | 0,98                              | 0,99 | trans+, vapores de HCl-                              |
| 2                   | $\alpha$ -criptoxantina    | 474, 444, 418                                           | 0,40                              | ---- | trans+, vapores de HCl-<br>acetilação+, metilação+   |
| 3                   | luteína                    | 472, 443, 418                                           | 0,17                              | 0,70 | trans+, vapores de HCl+/-<br>acet.+, met.+, epóxido- |
| 4                   | zeaxantina                 | 476, 448, (424)                                         | 0,10                              | 0,70 | trans+, vapores de HCl-,<br>acetilação+, metilação-  |
| 5                   | violaxantina               | 464, 435, 412                                           | 0,04                              | 0,40 | trans+, vapores de HCl+,<br>acetilação+, epóxido+    |
| 6                   | neoxantina                 |                                                         | 0,03                              | 0,27 | trans+, vapores de HCl+                              |

1: As frações correspondem às ilustradas na Figura 7.

2: Os carotenóides estão na forma trans.

3: Parênteses significam ombro no lugar de pico.

4: Camada delgada de sílica gel. Sistemas de solvente: A- 3% de metanol em benzeno e B- 30% acetona em éter de petróleo.

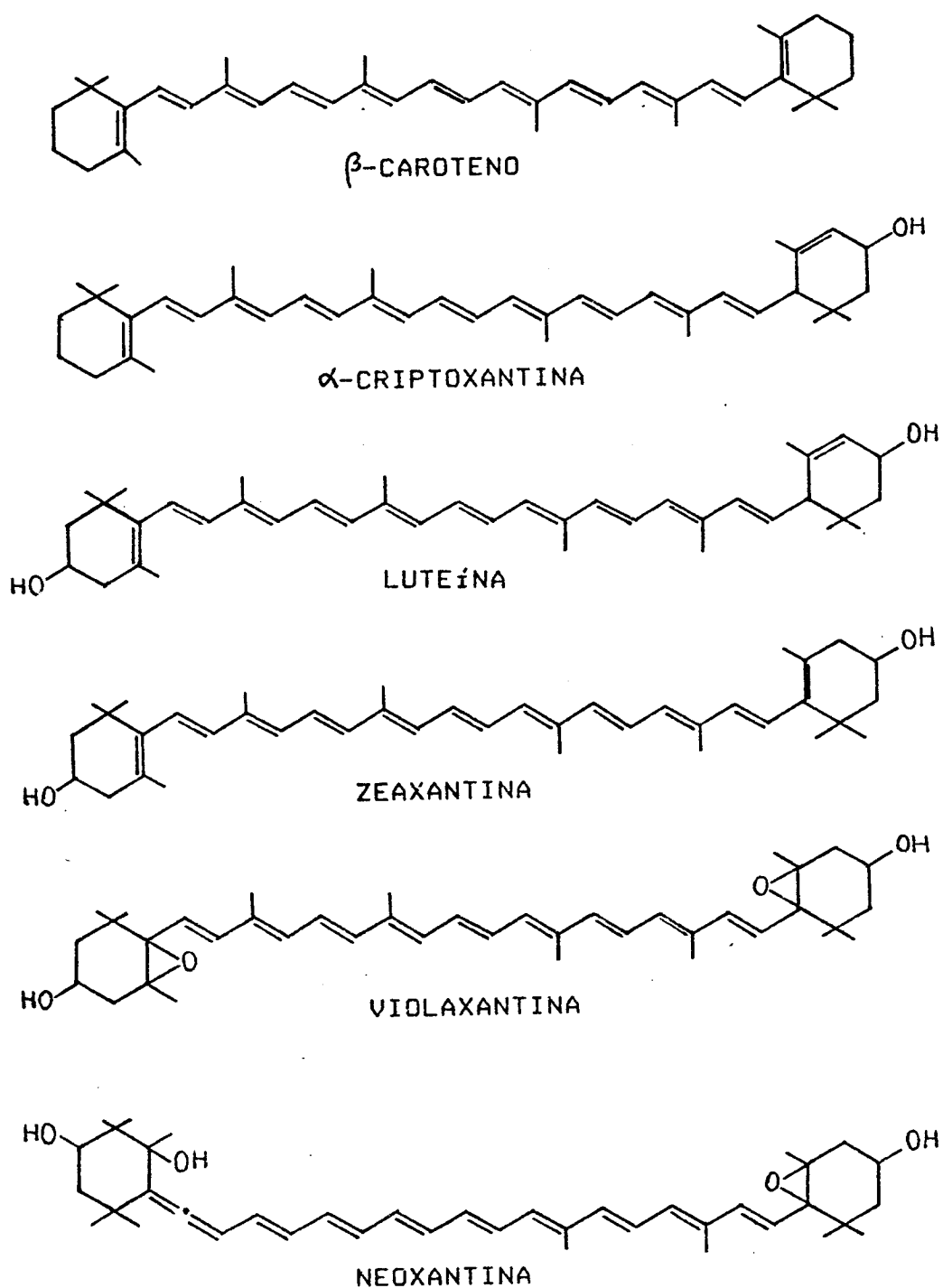


FIGURA 6: Estruturas dos carotenóides identificados em verduras folhosas verdes.

Método Rodriguez et al. (1976)

Fase estacionária: hiflosupercel:MgO (2:1)

Fase móvel: concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo

Tempo da cromatografia em coluna: 1h 30min

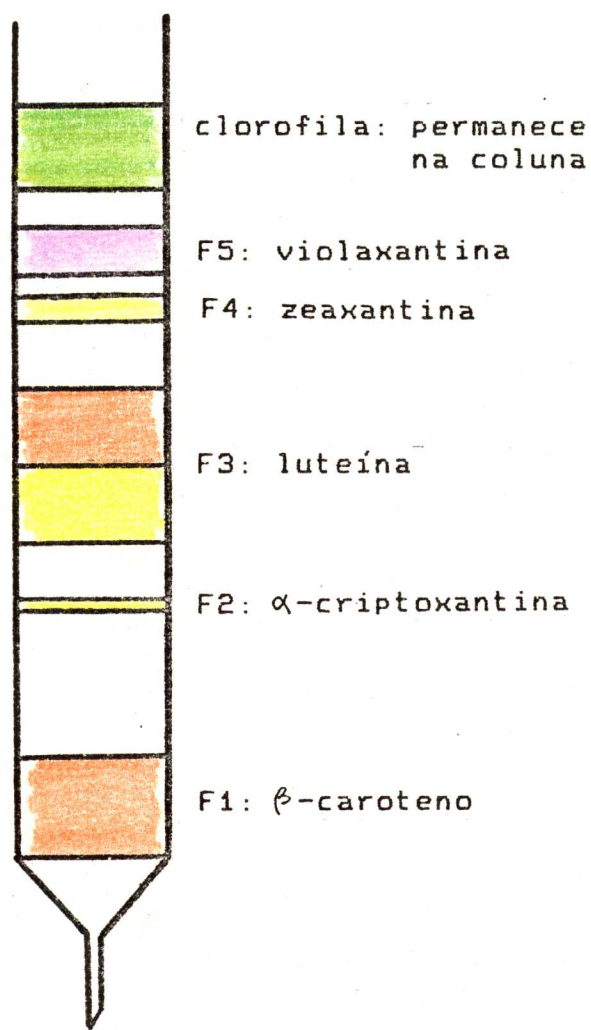
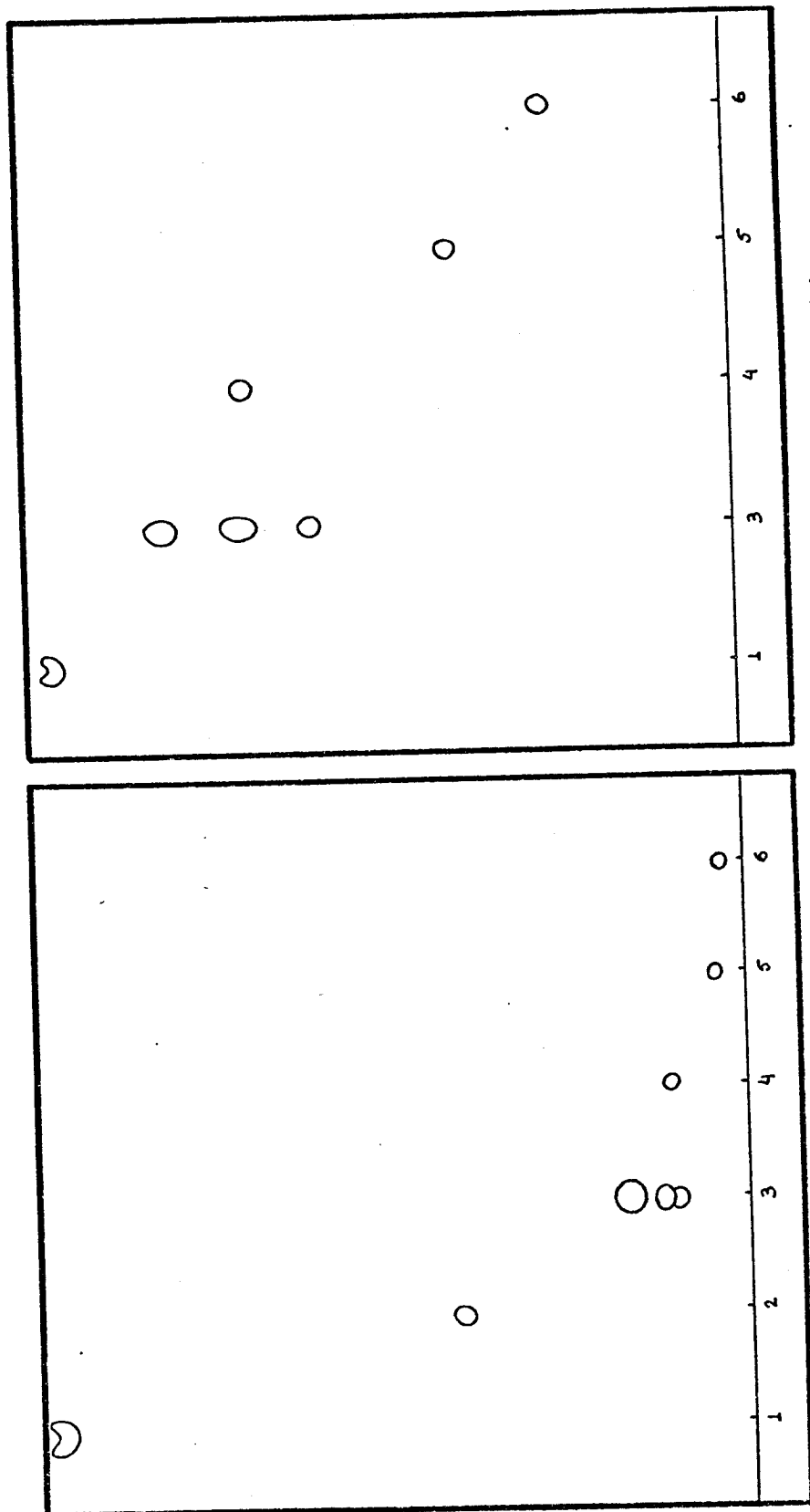


FIGURA 7: Separação dos carotenóides de verduras folhosas verdes em coluna



1:  $\beta$ -caroteno, 2:  $\alpha$ -criptoxantina, 3: luteína, 4: zeaxantina,

5: violaxantina e 6: neoxantina.

FIGURA 8: Separação dos carotenóides de verduras folhosas em placa de sílica gel desenvolvida por 3% de metanol em benzeno.

FIGURA 9: Separação de carotenóides de verduras folhosas em placa de sílica gel desenvolvida por 30% de acetona em éter de petróleo.



ra 10), esta fração foi identificada como  $\beta$ -caroteno.

O carotenóide  $\alpha$ -criptoxantina, fração 2, com espectro de absorção característico do cromóforo de  $\alpha$ -caroteno (Figura 10). De coloração laranja na camada delgada e amarela na coluna apresentou Rf de 0,40 na camada, que é indicativo de monoidroxilados. A presença do grupo hidroxila foi confirmada pela reação positiva à acetilação, e a sua posição alílica pela resposta positiva à metilação.

A fração 3 apresentou-se na coluna de MgO e hiflosuper-cel dividida em duas bandas, uma amarela e outra laranja. Na camada delgada, essa fração se dividiu também em três manchas com Rfs de 0,17; 0,10 e 0,09 quando a placa foi desenvolvida com 3% de metanol em benzeno e Rfs de 0,81; 0,70 e 0,60 quando usou-se 30% de acetona em éter de petróleo, indicando que o carotenóide é diidroxilado. Quando submetida à vapores de HCl, a última mancha, nos dois casos, tornou-se azul, indicando a presença de um grupo epóxido. Porém quando adicionou-se gotas de HCl 0,1N, não houve mudança no comprimento de onda, indicando não ser 5,6 epóxido. Como o espectro de absorção característico (Figura 10) não está deslocado 20 ou 40 nm em relação ao  $\beta$ -caroteno, não é 5,8 epóxido. Provavelmente esta última mancha seja de um epóxido da luteína, mas como está em quantidade muito pequena, não influe no espectro do composto principal. Portanto este pigmento foi identificado como luteína pelo: 1-espectro de absorção típico da estrutura básica do  $\alpha$ -caroteno; 2-reação positiva à acetilação, con-

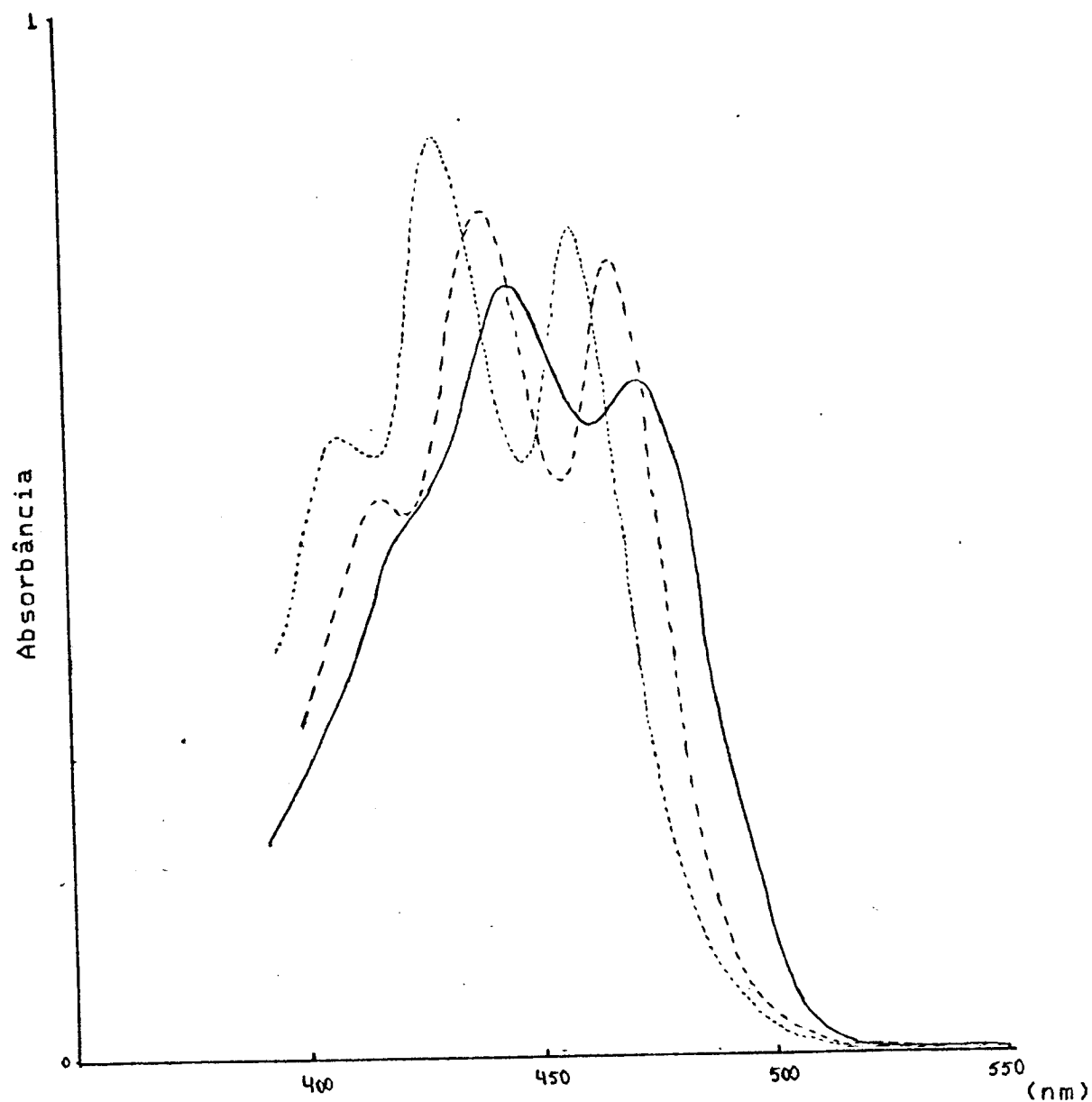


FIGURA 10: Espectros de absorção em éter de petróleo de  $\beta$ -caroteno e zeaxantina (—),  $\alpha$ -criptoxantina e luteína (---), e violaxantina (...).

firmando a presença de grupos hidroxilas; 3-metilação positiva, produzindo um composto monoidroxilado que demonstra a posição alílica de um dos grupos hidroxilas. É característico da luteína mostrar "multi-zoning" na camada e na coluna.

A fração 4, de cor amarela na coluna e laranja na placa, apresentou Rf de 0,1 na placa desenvolvida com 3% de metanol em benzeno indicando ser um carotenóide diidroxilado, comprovada pela reação positiva à acetilação. A posição não alílica das hidroxilas foi demonstrada pela resposta negativa à metilação. O seu espectro de absorção é idêntico ao do  $\beta$ -caroteno (Figura 10), e o pigmento foi identificado como zeaxantina.

A violaxantina, fração 5, de cor rosa claro na coluna e laranja na placa de sílica gel, apresentou Rfs de 0,04 e 0,40 quando aplicada em placa de sílica gel e desenvolvida por 3% de metanol em benzeno e 30% de acetona em éter de petróleo, respectivamente. Esses valores de Rf são característicos de carotenóides diidroxilados, que foi confirmado com reação de acetilação positiva. Quando submetida a vapores de HCl, a mancha na placa tornou-se azul, indicando ser um epóxi carotenóide. Com adição de gotas de HCl 0,1N, exibiu efeito hipsocrômico de 40 nm, indicando possuir dois grupos 5,6 epóxidos (Figuras 10 e 11).

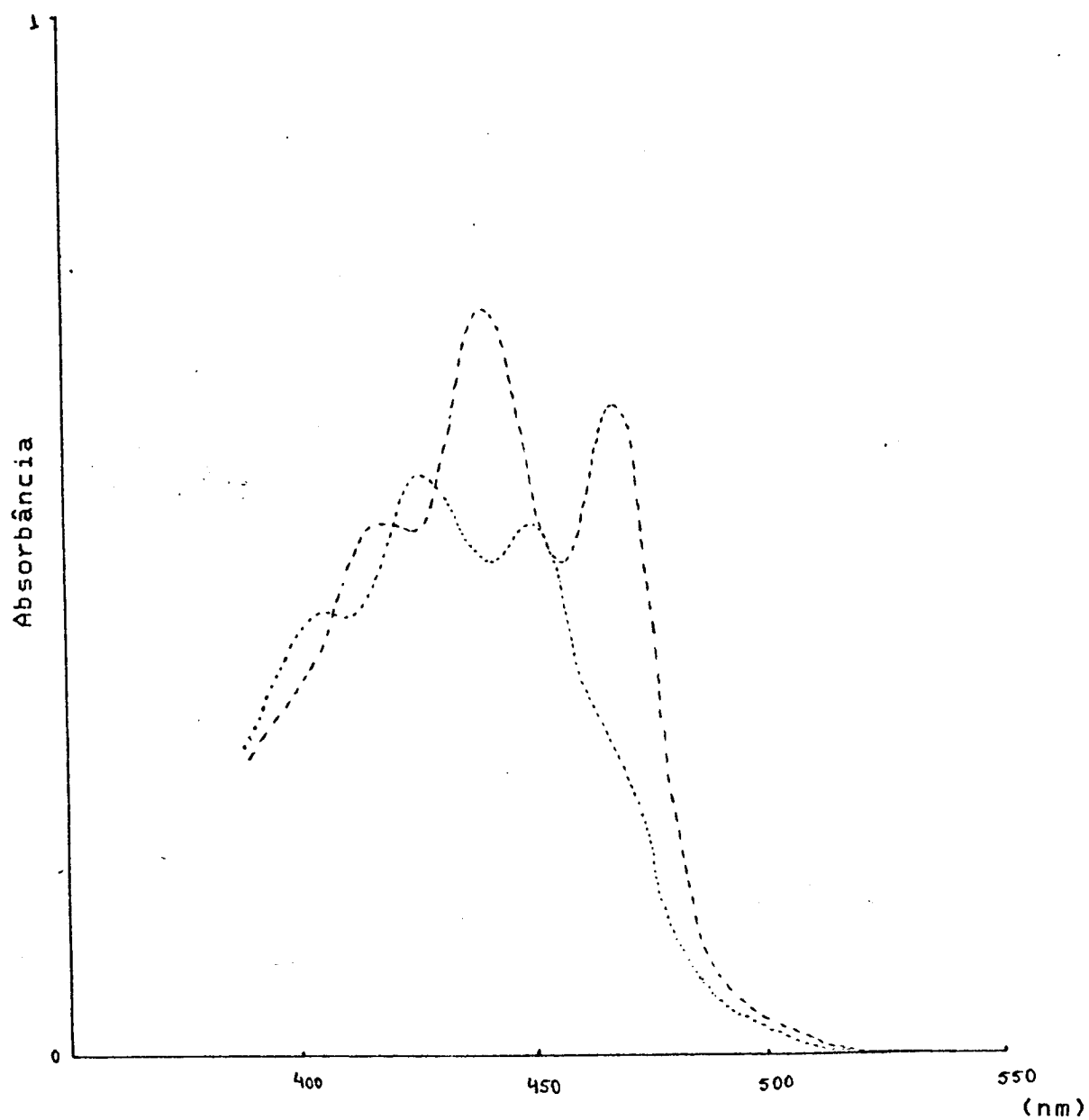


FIGURA 11: Espectros de absorção da violaxantina em etanol 95%  
(---) e após adição de HCl 0,1N (...).

#### 4.3. INFLUÊNCIA DE CULTIVAR, ESTAÇÃO DO ANO E DE CONDIÇÕES DE CULTIVO EM COUVE.

Embora seja amplamente reconhecida que a composição de carotenóides do mesmo alimento pode variar em função da variedade cultivada, estágio de maturação, condições de plantio, clima e de outros fatores, estes efeitos são raramente quantificados.

Em nosso laboratório já foi visto que a composição quantitativa e às vezes qualitativa de carotenóides pode variar em frutas como goiaba, mamão e manga devido às diferentes cultivares e regiões geográficas (Padula & Rodriguez-Amaya, 1986, Kimura & Rodriguez-Amaya, 1987 e Godoy & Rodriguez-Amaya, 1988). Foi demonstrado também que as folhas de alface e chicória maduras continham um valor de  $\beta$ -caroteno cerca de 3 vezes maior que as folhas novas (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987).

Para estudar a influência de alguns fatores na composição de carotenóides no presente trabalho, escolheu-se couve porque a amostragem é mais fácil de ser executada e repetida, além de ser disponível praticamente o ano inteiro.

Para verificar a influência de cultivar, estação do ano e de condições de cultivo em couve, foram analisadas 10 amostras de cada uma das seguintes combinações (com exceção da condição cultivar tronchuda, estação verão, horta natural para a qual analisou-se 9 amostras): 1-cultivar manteiga, estação verão, horta

natural (Tabela 5); 2-cultivar manteiga, estação verão, horta comercial (Tabela 6); 3-cultivar manteiga, estação inverno, horta natural (Tabela 7); 4-cultivar tronchuda, estação verão, horta natural (Tabela 8) e 5-cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural (Tabela 9).

Os dados apresentados nas Figuras 12, 13 e 14 indicaram que houve diferença significativa a um nível de 5% entre os teores (A e B, C e D) de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina e valor de vitamina A entre as cultivares manteiga e tronchuda, ambas provenientes da horta natural, tanto no período de inverno como no de verão. O conteúdo de zeaxantina foi maior e o de  $\beta$ -caroteno, consequentemente o valor de vitamina A, menor na couve manteiga do que na tronchuda em ambas estações. Os teores (C e D) de luteína, violaxantina e total de carotenóides foram significativamente maiores na cultivar tronchuda do que na manteiga no período de verão. No entanto, não houve diferença significativa (A e B) para esses pigmentos entre as cultivares no período de inverno (Figuras 15, 16 e 17).

Observou-se também uma diferença significativa a um nível de 5% entre inverno e verão para as duas cultivares de couve nos teores (A e C, B e D) de  $\beta$ -caroteno, valor de vitamina A e zeaxantina, que apresentaram-se maiores no inverno, coincidindo com a estação de maior produção (Figuras 12, 13 e 14). Os teores (A e C) de luteína e total de carotenóides foram também signifi-

TABELA 5: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de couve MANTEIGA, colhida no VERÃO, proveniente de horta NATURAL.

| CAROTENÓIDES<br>E VALOR DE<br>VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|----------------|
|                                          | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA          |
| $\beta$ -caroteno                        | 43,88                                         | 2,67  | 40,69 - 48,42  |
| $\alpha$ -criptoxantina                  | -----                                         | ----- | N.D. -traços   |
| luteína                                  | 83,54                                         | 9,18  | 70,21 - 97,70  |
| zeaxantina                               | 2,11                                          | 1,52  | traços- 4,13   |
| violaxantina                             | 19,06                                         | 2,54  | 15,64 - 25,00  |
| total                                    | 148,59                                        | 9,74  | 131,74 -163,55 |
| valor vitamina<br>A (RE/100g)            | 731,4                                         | 44,5  | 678,2 -807,0   |

1: Resultado de 10 amostras.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

TABELA 6: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de couve MANTEIGA, colhida no VERÃO, proveniente de horta CONVENCIONAL

| CAROTENÓIDES<br>E VALOR DE<br>VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|----------------|
|                                          | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA          |
| $\beta$ -caroteno                        | 37,92                                         | 6,91  | 23,16 - 43,84  |
| $\alpha$ -criptoxantina                  | ----                                          | ----  | traços -traços |
| luteína                                  | 71,36                                         | 7,88  | 56,89 - 80,57  |
| zeaxantina                               | 2,52                                          | 0,41  | traços - 2,95  |
| violaxantina                             | 16,42                                         | 1,75  | 13,54 - 19,89  |
| total                                    | 126,71                                        | 13,86 | 105,59 -140,42 |
| valor vitamina<br>A (RE/100g)            | 626,5                                         | 111,2 | 386,1 -730,7   |

1: Resultado de 10 amostras.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.



TABELA 7: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de couve MANTEIGA, colhida no INVERNO, proveniente de horta NATURAL.

| CAROTENÓIDES<br>E VALOR DE<br>VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                 |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|-----------------|
|                                          | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA           |
| $\beta$ -caroteno                        | 54,08                                         | 4,49  | 46,98 - 61,67   |
| $\alpha$ -criptoxantina                  | 0,52                                          | 0,85  | N.D. - 2,13     |
| luteína                                  | 110,93                                        | 15,74 | 82,04 - 129,99  |
| zeaxantina                               | 3,24                                          | 1,83  | N.D. - 5,44     |
| violaxantina                             | 17,68                                         | 7,27  | 11,64 - 33,37   |
| total                                    | 186,45                                        | 20,68 | 155,02 - 213,48 |
| valor vitamina<br>A (RE/100g)            | 905,7                                         | 73,8  | 783,0 - 1027,8  |

1: Resultado de 10 amostras.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

TABELA 8: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de couve TRONCHUDA, colhida no VERÃO, proveniente de horta NATURAL.

| CAROTENÓIDES<br>E VALOR DE<br>VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|----------------|
|                                          | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA          |
| $\beta$ -caroteno                        | 56,52                                         | 8,12  | 46,96 - 68,98  |
| $\alpha$ -criptoxantina                  | -----                                         | ----  | N.D. -traços   |
| luteína                                  | 109,37                                        | 10,70 | 89,58 -128,20  |
| zeaxantina                               | 1,49                                          | 0,99  | N.D. - 2,47    |
| violaxantina                             | 25,73                                         | 3,03  | 21,72 - 29,86  |
| total                                    | 193,11                                        | 19,75 | 163,41 -229,52 |
| valor vitamina<br>A (RE/100g)            | 942,1                                         | 135,3 | 782,7 -1149,6  |

1: Resultado de 9 amostras.

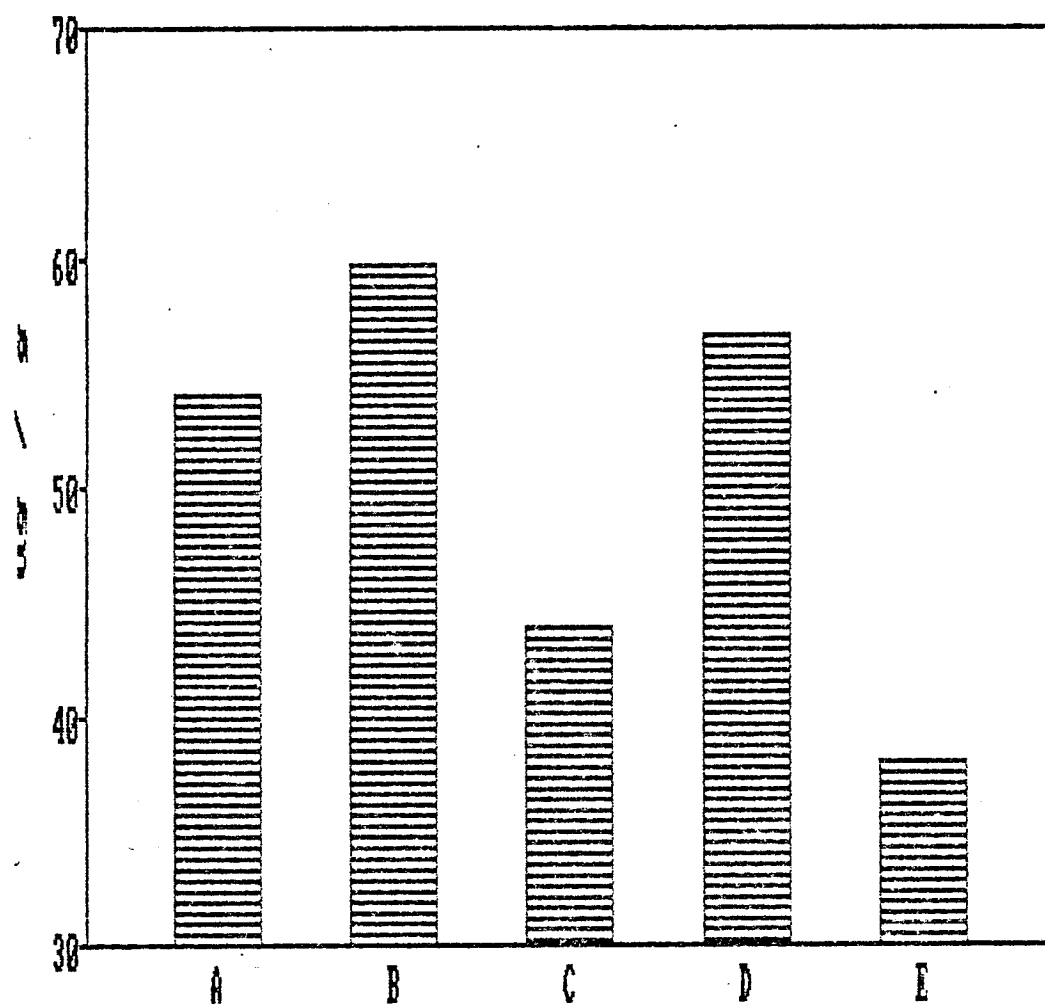
D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

TABELA 9: Composição de carotenóides e valor de vitamina A de couve TRONCHUDA, colhida no INVERNO, proveniente de horta NATURAL.

| CAROTENÓIDES<br>E VALOR DE<br>VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|----------------|
|                                          | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA          |
| $\beta$ -caroteno                        | 59,55                                         | 13,72 | 47,11 - 85,67  |
| $\alpha$ -criptoxantina                  | -----                                         | ----- | N.D. -tracos   |
| luteína                                  | 114,11                                        | 9,84  | 98,81 -133,13  |
| zeaxantina                               | 2,02                                          | 1,49  | tracos- 3,94   |
| violaxantina                             | 18,71                                         | 3,21  | 15,65 - 27,02  |
| total                                    | 194,39                                        | 23,84 | 177,34 -240,58 |
| valor vitamina                           |                                               |       |                |
| A (RE/100g)                              | 992,5                                         | 228,7 | 785,2 -1426,1  |

1: Resultado de 10 amostras.

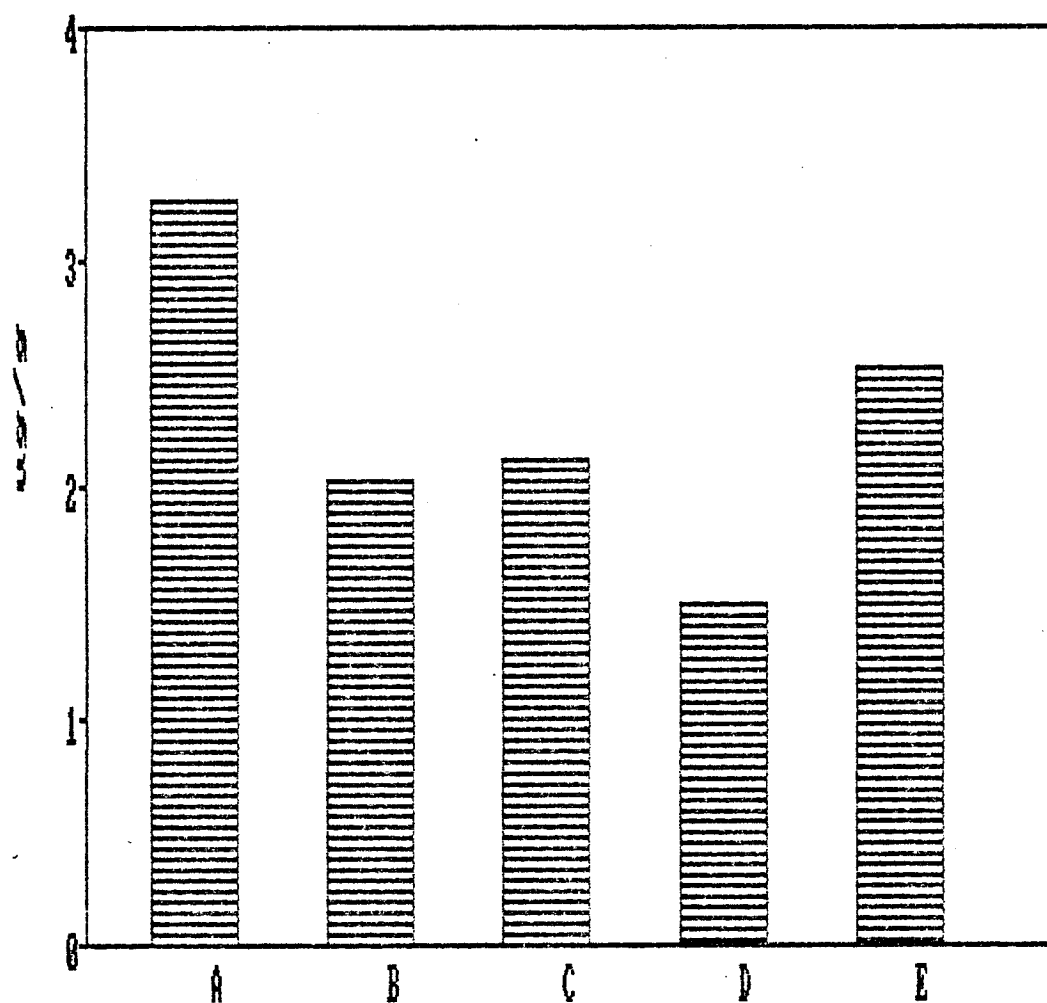
D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.



A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre A e B; C e D; A e C; B e D; C e E ( $p \leq 0,05$ ).

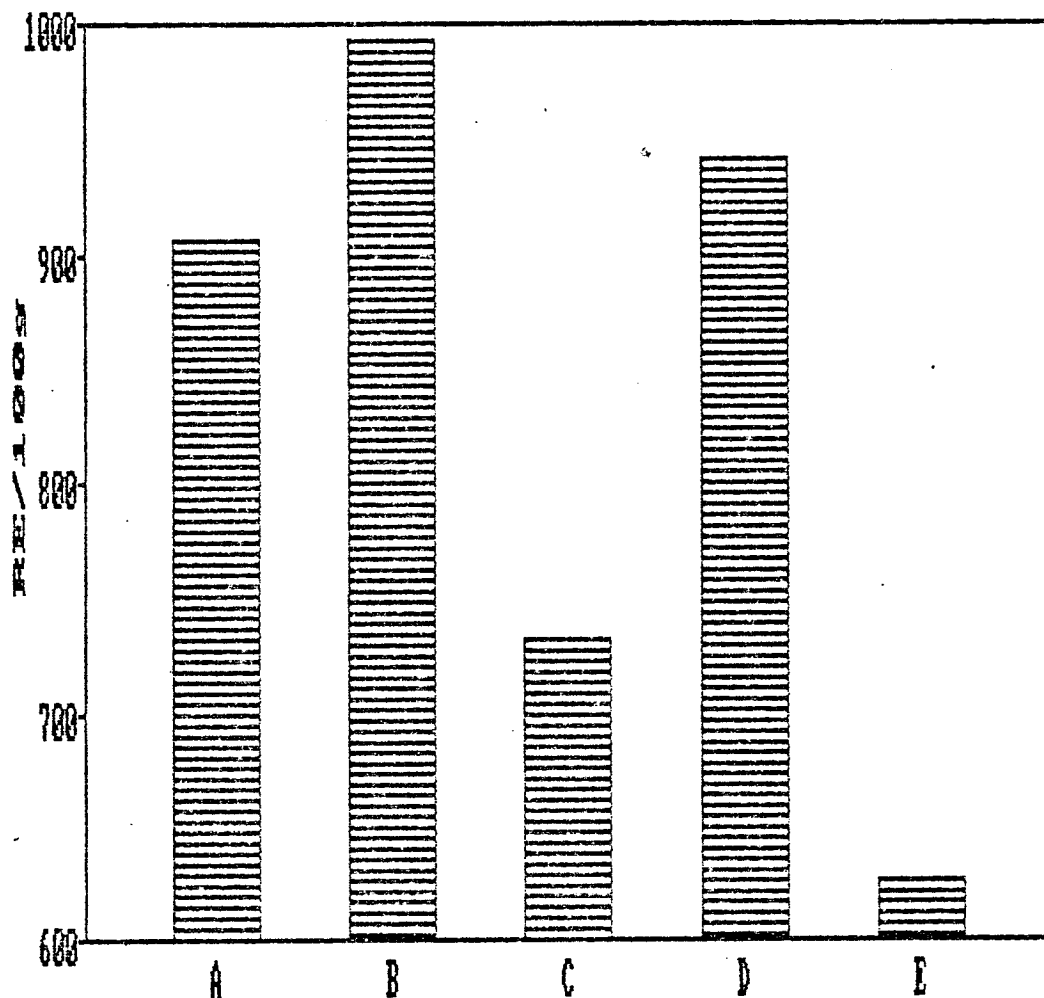
FIGURA 12: Comparação dos teores de  $\beta$ -caroteno em couve.



- A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre A e B; C e D; A e C; B e D; C e E ( $p \leq 0,05$ ).

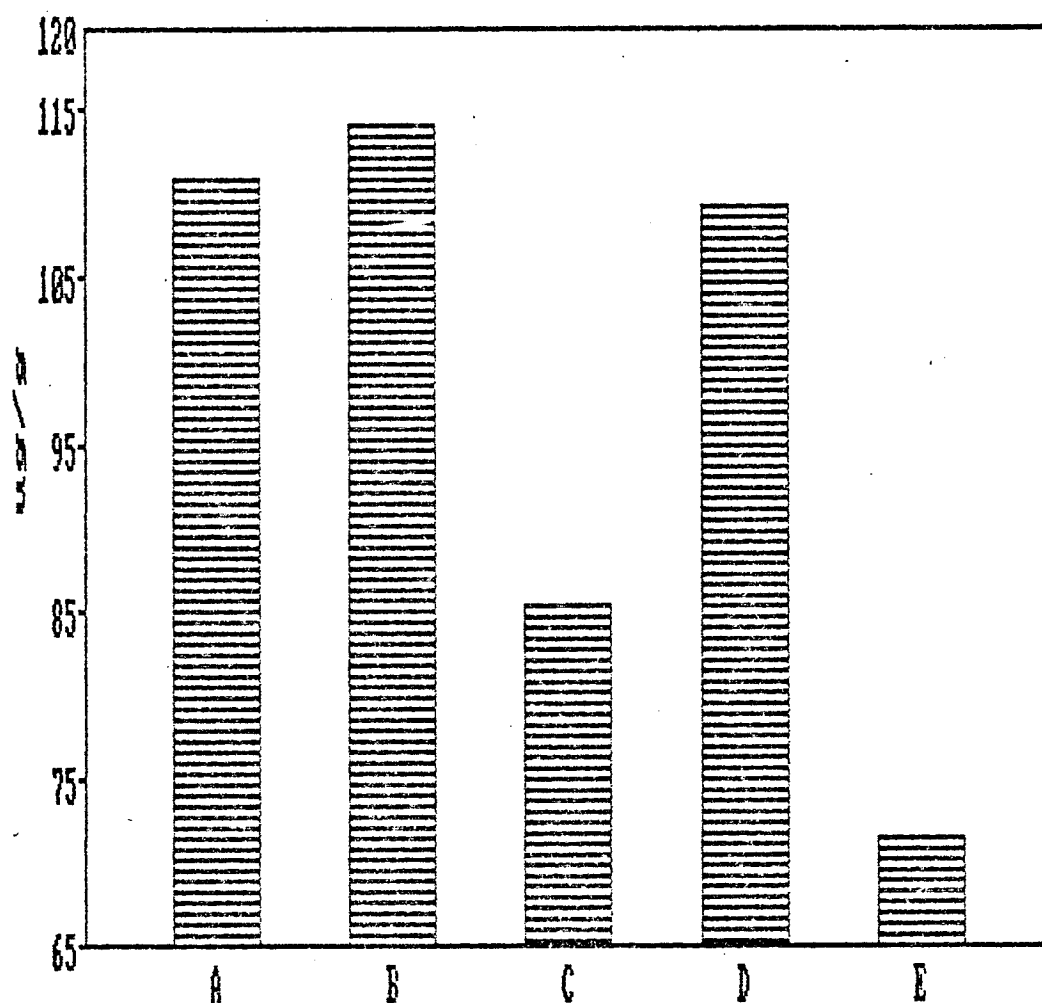
FIGURA 13: Comparação dos teores de zeaxantina em couve.



- A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre A e B; C e D; A e C; B e D; C e E ( $p \leq 0,05$ ).

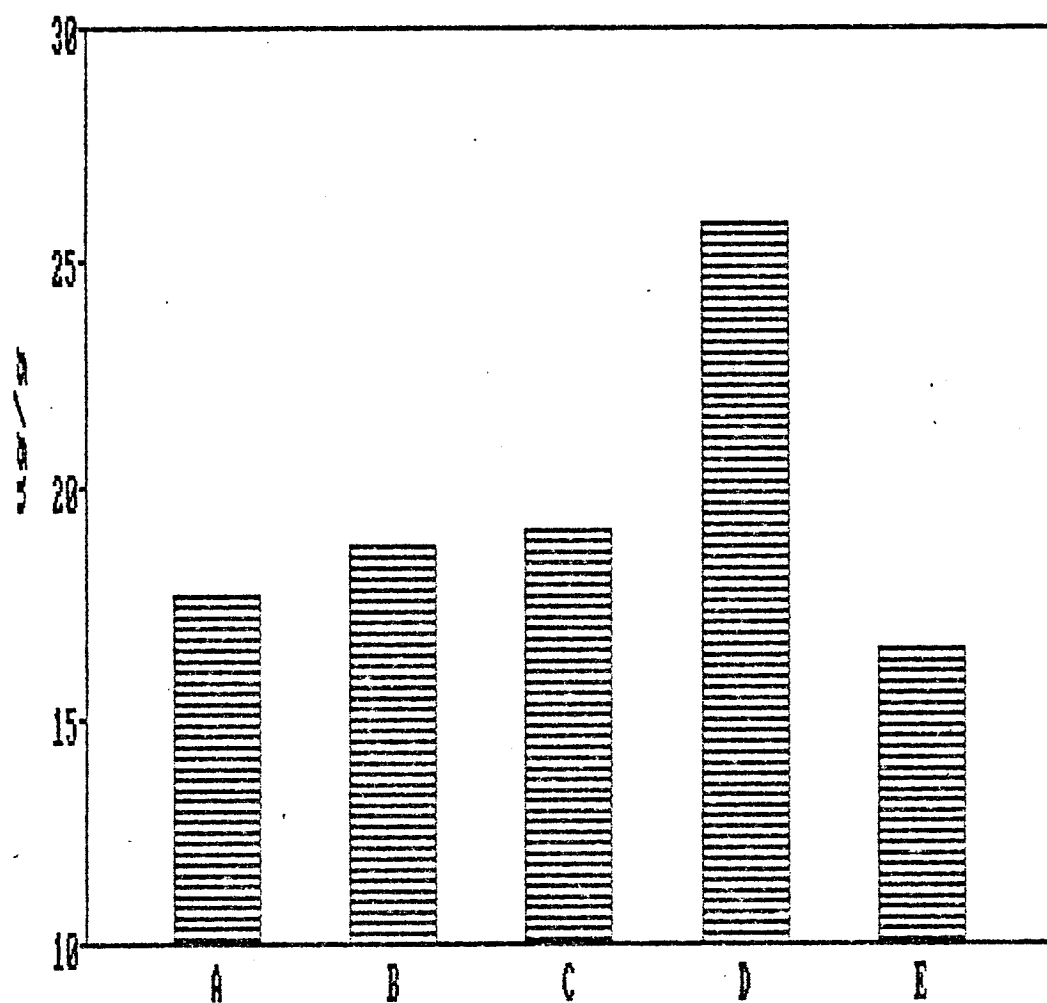
FIGURA 14: Comparação dos valores de vitamina A em couve.



A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre C e D; A e C; C e E ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre A e B; B e D ( $p \leq 0,05$ ).

FIGURA 15: Comparação dos teores de luteína em couve.

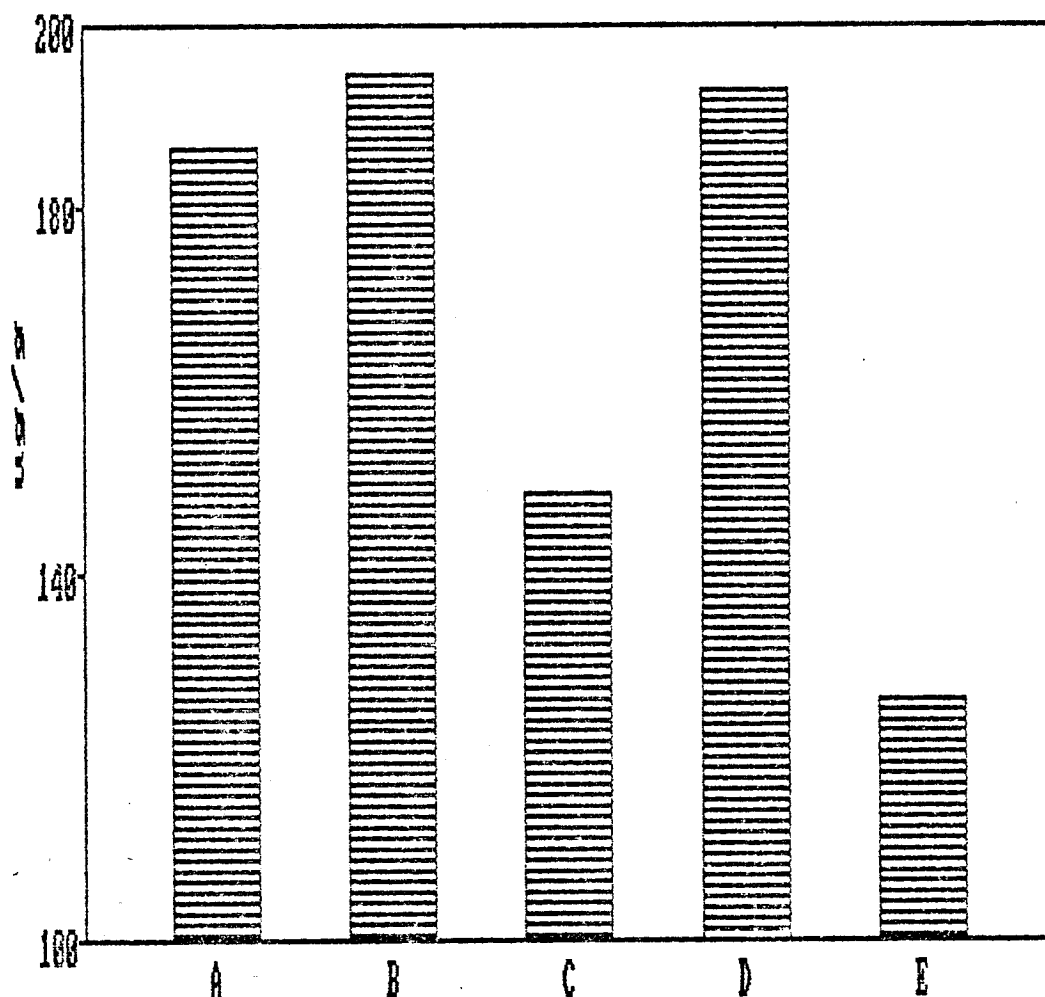


- A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre C e D; B e D; C e E ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre A e B; A e C ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 16: Comparação dos teores de violaxantina em couve.





A- Cultivar manteiga, estação inverno, horta natural  
 B- Cultivar tronchuda, estação inverno, horta natural  
 C- Cultivar manteiga, estação verão, horta natural  
 D- Cultivar tronchuda, estação verão, horta natural  
 E- Cultivar manteiga, estação verão, horta convencional

Houve diferença significativa entre C e D; A e C; C e E ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre A e B; B e D ( $p \leq 0,05$ ).

FIGURA 17: Comparação dos teores totais de carotenóides em couve.

cativamente maiores na couve manteiga colhida no inverno do que na de verão, não havendo diferença significativa entre os teores (B e D) em couve tronchuda de inverno e verão (Figuras 15 e 17). Já a violaxantina exibiu um comportamento contrário, pois o seu teor (B e D) foi significativamente maior no verão do que no inverno na couve tronchuda, e não houve diferença significativa entre as concentrações (A e C) em couve manteiga de inverno e verão (Figura 16).

No período de verão, os teores (C e E) de  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina, total de carotenóides e valor de vitamina A de couve manteiga colhida na horta natural foram significativamente maiores que os da horta convencional (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17) na qual foram utilizados o herbicida-glyphosate e o inseticida "rodia tox".

Não foi encontrado nenhum trabalho sobre o efeito do glyphosate e "rodia tox" na literatura. No entanto, a influência de outros herbicidas e inseticidas foram estudados por vários autores, com resultados conflitantes.

Rouchaud et al. (1985) relatou aumentos nos teores de  $\beta$ -caroteno de cerca de 48, 23, 33 e 36% quando as alfaces sofreram tratamento com propyzamida, chlorpropham, propyzamida + chlorpropham e iprodione; o tratamento com benomyl e vinclozolina não alterou o conteúdo de  $\beta$ -caroteno em relação ao controle. Quanto aos teores de xantofilas, houve um aumento de 30% com propyzamida, chlorpropham e mistura de ambos e de 28% com iprodione. Não houve alteração com benomyl e uma diminuição de 23%

foi constatada com vinclozolina. Já em outro trabalho (Rouchaud et al., 1984), as alfaces tratadas com a mistura de propyzamida + chlorpropham e iprodione apresentaram maiores níveis de  $\beta$ -caroteno que o controle; com chlorpropham e benomyl menores teores e com propyzamida e vinclozolina teores similares.  $\beta$ -Criptoxantina, luteína, violaxantina e neoxantina aumentaram com propyzamida, chlorpropham, sua mistura e iprodione, mas não sofreram alteração com benomyl e vinclozolina.

Os resultados obtidos por Salminen et al. (1970) nos estudos com cenoura, indicaram que as concentrações de carotenos foram mais baixas nas amostras que sofreram tratamento com os herbicidas chlorpropham e linuron. Este mesmo efeito também foi relatado por Beckman & Pestemer (1975) com o herbicida linuron, e Bhagat (1976) com chloroxuron, linuron e nitrofen. Já Sweeney & Marsh (1971a) relataram maiores teores de carotenos ( $p \leq 0.01$ ) em cenouras tratadas com chlorpropham e linuron.

Venter (1979) e Habben (1973) relataram que um aumento no nível de nitrogênio no solo resultou em um aumento no conteúdo de caroteno em cenoura, mas diferentes quantidades de potássio não tiveram efeito (Habben, 1973). Beckman (1976) obteve teores de  $\beta$ -caroteno em cenoura significativamente maiores quando foram usados fertilizantes orgânicos. Vereecke & Maercke (1979) também encontraram menores teores de  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno e xantofilas em cenoura cultivada em solo sem fertilizantes (controle) e que não houve diferença entre os diversos tratamentos (N P K Mg, P K Mg, N P Mg e N P K), que tiveram teores maiores que o controle.

O teor de carotenóides de duas cultivares de batata doce não foi afetado pelo pH nem pela adição de fertilizantes (Constantin et al., 1975).

Bushway et al. (1986) relataram diferença significativa no teor de  $\beta$ -caroteno de tomate, pimentão verde, cenoura, (melão) "cantaloupe" e "swiss chard" provenientes de supermercados e pontos de venda à beira da estrada. Com exceção de 4 dos 12 itens analisados, os conteúdos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno foram maiores para os alimentos provenientes da beira da estrada do que do supermercado. O autor lembra que os alimentos obtidos na beira da estrada estavam mais frescos que os do supermercado, e que essa diferença pode ser atribuída à variações genéticas, no solo, clima e maturidade.

Teores de  $\beta$ -caroteno significativamente maiores em couve de bruxelas e menores em repolho foram obtidos em solo fertilizado com lodo de esgoto municipal em comparação com solo com igual quantidade de compostos orgânicos. Não houve diferença significativa para brócoli proveniente dos dois tratamentos acima. Após colheita, os vegetais foram liofilizados, e o repolho estocado por um ano até a análise (Goodrick et al., 1988).

Stewart (1977 a) relatou diferenças consideráveis entre os valores de vitamina A de sucos de laranja de sete diferentes cultivares: sucos das cultivares de laranja doce (hamlin, pineapple e valencia) apresentaram o menor valor, as tangerinas dancy e robinson valores intermediários e o híbrido murcott o maior valor entre todas as cultivares estudadas. Além da diferença quantita-

tiva, foram encontrados 17 e 15 carotenóides nas cultivares de laranja spanish e turkish, respectivamente (Valadon & Mummery, 1981).

Analisando 8 cultivares de cenoura, provenientes de diferentes regiões da Tchecoslováquia, Blattna et al. (1976) observaram que a área de cultivo teve pequeno efeito nos conteúdos de  $\beta$ -caroteno e de carotenóides totais que variaram, respectivamente, de 26,9 a 9,44 e de 29,60 a 10,68 (mg/100g de matéria seca). Diferenças entre cultivares também foram relatadas em trigo durum (Dovkin et al., 1984) e aipo (Fraczek et al., 1977).

Apesar dos trabalhos encontrados na literatura não especificarem o cultivar analisado, todos os dados obtidos no presente trabalho, referentes a couve manteiga, o cultivar mais comum no estado de São Paulo, foram colocados na Tabela 10 para fins comparativos.

Analisando 10 amostras de couve manteiga adquiridas em diferentes épocas durante o ano, Ramos & Rodriguez-Amaya (1987), encontraram teores de  $\beta$ -caroteno que variaram de 23,6 a 59,0  $\mu\text{g/g}$ , um intervalo que concorda perfeitamente com o obtido neste trabalho (23,16 - 61,67  $\mu\text{g/g}$ ). A média menor relatada por Ramos & Rodriguez-Amaya ( $35,1 \pm 12,9$  vs.  $45,29 \pm 8,17$   $\mu\text{g/g}$ ) é compreensível uma vez que o objetivo do primeiro trabalho foi apresentar a variação das amostras oferecidas ao consumidor pelo comércio no ano inteiro, refletindo inclusive a variação devido ao estágio de maturação (no presente trabalho somente folhas maduras foram

TABELA 10: Composição média de carotenóides e valor de vitamina A de couve cultivar manteiga.

| CAROTENÓIDES/<br>VALOR VITAMINA A | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |                 |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-------|-----------------|
|                                   | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA           |
| $\beta$ -caroteno                 | 45,29                                         | 8,17  | 23,16 - 61,67   |
| $\alpha$ -criptoxantina           | 0,17                                          | 0,30  | N.D. - 2,13     |
| luteína                           | 88,61                                         | 20,26 | 56,89 - 129,99  |
| zeaxantina                        | 2,62                                          | 0,57  | N.D. - 5,44     |
| violaxantina                      | 18,82                                         | 2,28  | 11,64 - 33,37   |
| total                             | 153,93                                        | 30,25 | 105,59 - 213,48 |
| valor vitamí-                     |                                               |       |                 |
| na A (RE/100g)                    | 754,5                                         | 141,0 | 386,1 - 1027,8  |

1: Resultado de 30 amostras coletadas no inverno em horta natural e no verão em horta comercial e natural.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado

incluídas) e a maior participação de verduras provenientes de hortas comerciais que naturais. Além disso, as amostras no presente trabalho foram colhidas diretamente das hortas, enquanto que no trabalho anterior, foram compradas em pontos de venda tendo, portanto, um tempo variável entre colheita e comercialização.

Os teores de  $\beta$ -caroteno em couve obtidos por Burcher et al. (1956) e por Sweeney & Marsh (1971b), 47,9 e 47,2  $\mu\text{g/g}$  respectivamente, foram coerentes com o observado neste trabalho (Tabela 10). Já, a concentração de  $\beta$ -caroteno encontrada por Fitzgerald & Fellers (1938) foi cerca de 6 vezes maior. Usou-se cromatografia em coluna aberta nestes três trabalhos.

Por outro lado, as concentrações de  $\beta$ -caroteno encontradas em couve por Quackenbush (1987) e Speek et al. (1988), ambos utilizando HPLC, foram cerca de 2 vezes maior e 18 vezes menor, respectivamente, que a encontrada neste trabalho (Tabela 10).

Khacik et al. (1986) identificaram e quantificaram os seguintes carotenóides em couve "in natura": trans e 9-cis neoxantina, neocromo, epóxido e cis epóxido de luteína, neoluteína B, B' e A, trans luteína, violaxantina e  $\beta$ -caroteno. Os principais carotenóides encontrados foram luteína (342  $\mu\text{g/g}$ ),  $\beta$ -caroteno (146  $\mu\text{g/g}$ ), violaxantina (67,3  $\mu\text{g/g}$ ) e 9 cis neoxantina (92,1  $\mu\text{g/g}$ ), sendo que os teores dos três primeiros foram cerca de 3 vezes maiores que os nossos resultados. O último foi apenas detectado no presente trabalho (Tabela 10). A presença de quantidades apreciáveis de epóxidos e cis isômeros nesse trabalho leva

à suspeita de que provavelmente ocorreu alguma degradação durante a análise, deixando ainda mais estranho a constatação de altos teores.



#### 4.4. COMPOSIÇÃO QUANTITATIVA DE CAROTENÓIDES EM VERDURAS FOLHOSAS NATIVAS

Devido à tendência dos países em desenvolvimento de desprestigiar as verduras nativas em favor de plantas importadas, foi determinada a composição de carotenóides em algumas verduras folhosas nativas.

O  $\beta$ -caroteno foi praticamente o único carotenóide precursor de vitamina A nas verduras folhosas nativas analisadas, perfazendo 27, 30, 24, 26 e 34% do total em caruru, mentruz, taioba, serralha e beldroega, respectivamente (Figuras 18, 19, 20, 21 e 22). O caruru apresentou o maior (109,85  $\mu\text{g/g}$ ) e a beldroega o menor teor (29,79  $\mu\text{g/g}$ ) de  $\beta$ -caroteno (Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15).

A luteína foi o carotenóide encontrado em maior quantidade: 59, 58, 61, 60 e 54% do total de carotenóides em caruru, mentruz, taioba, serralha e beldroega, nessa ordem (Figuras 18, 19, 20, 21 e 22). Em termos de concentração, o maior valor de luteína encontrado foi 236,97  $\mu\text{g/g}$  em caruru, e o menor 48,20  $\mu\text{g/g}$  em beldroega (Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15).

Já o maior teor de violaxantina foi encontrado em caruru (42,34  $\mu\text{g/g}$ ) e o menor em beldroega (9,10  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15). A porcentagem de violaxantina em relação ao

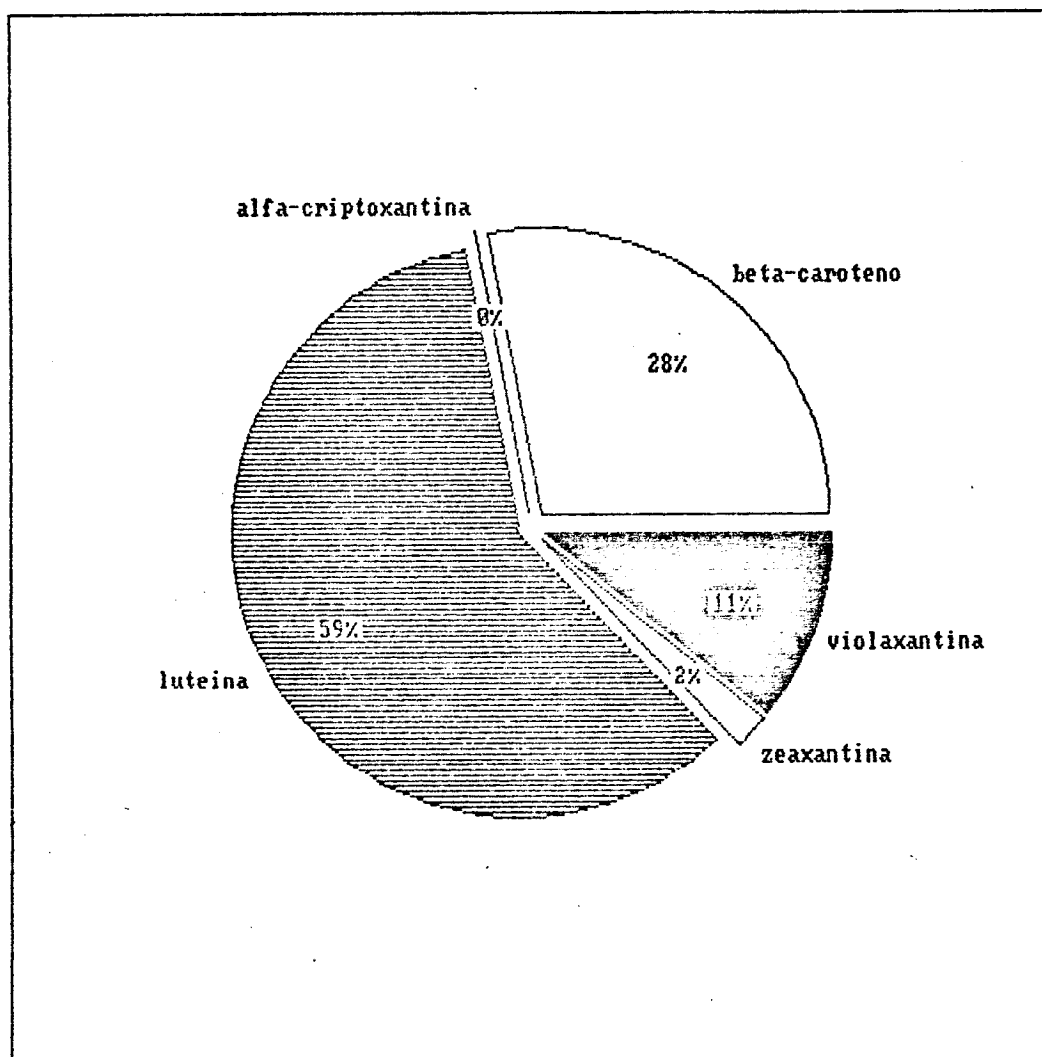


FIGURA 18: Distribuição dos carotenóides em caruru.

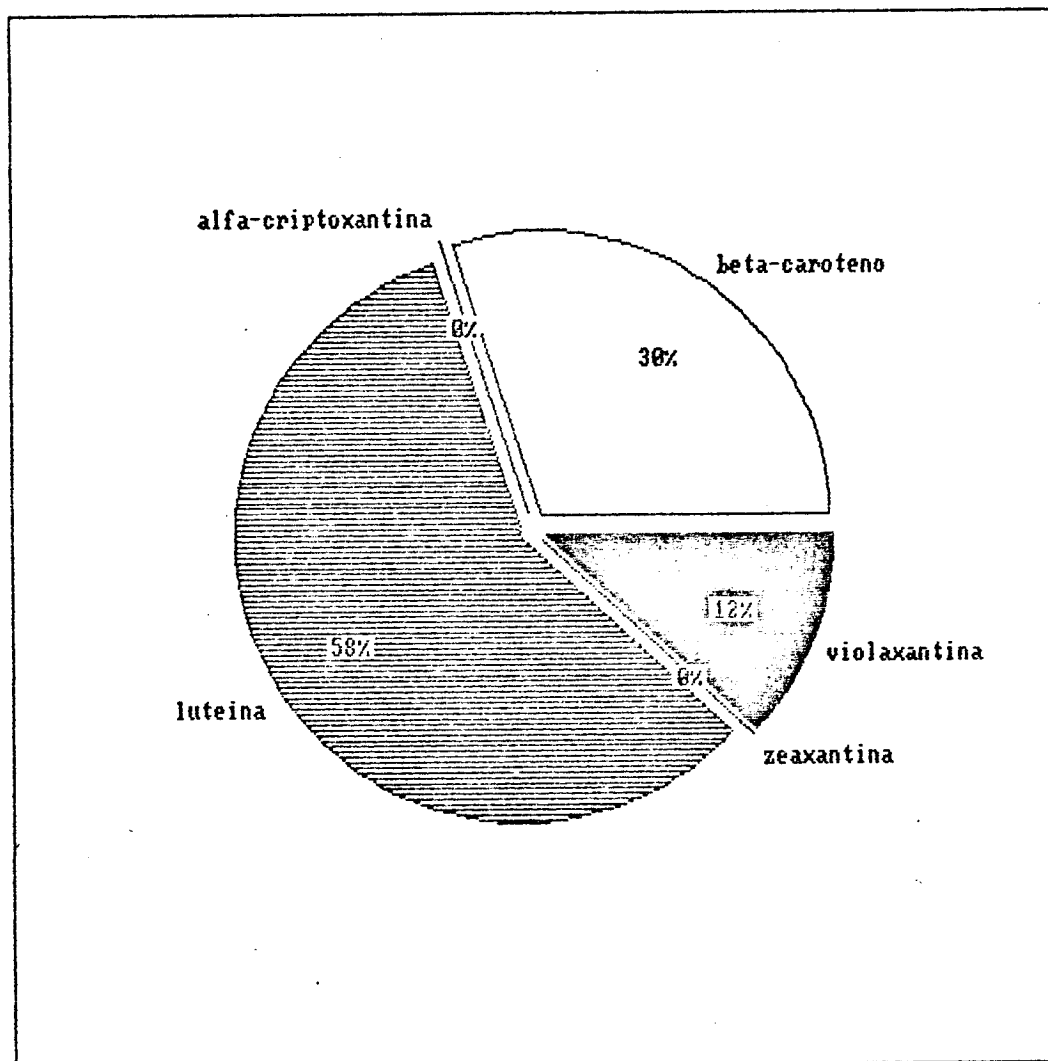


FIGURA 19: Distribuição dos carotenóides em mentruaz.

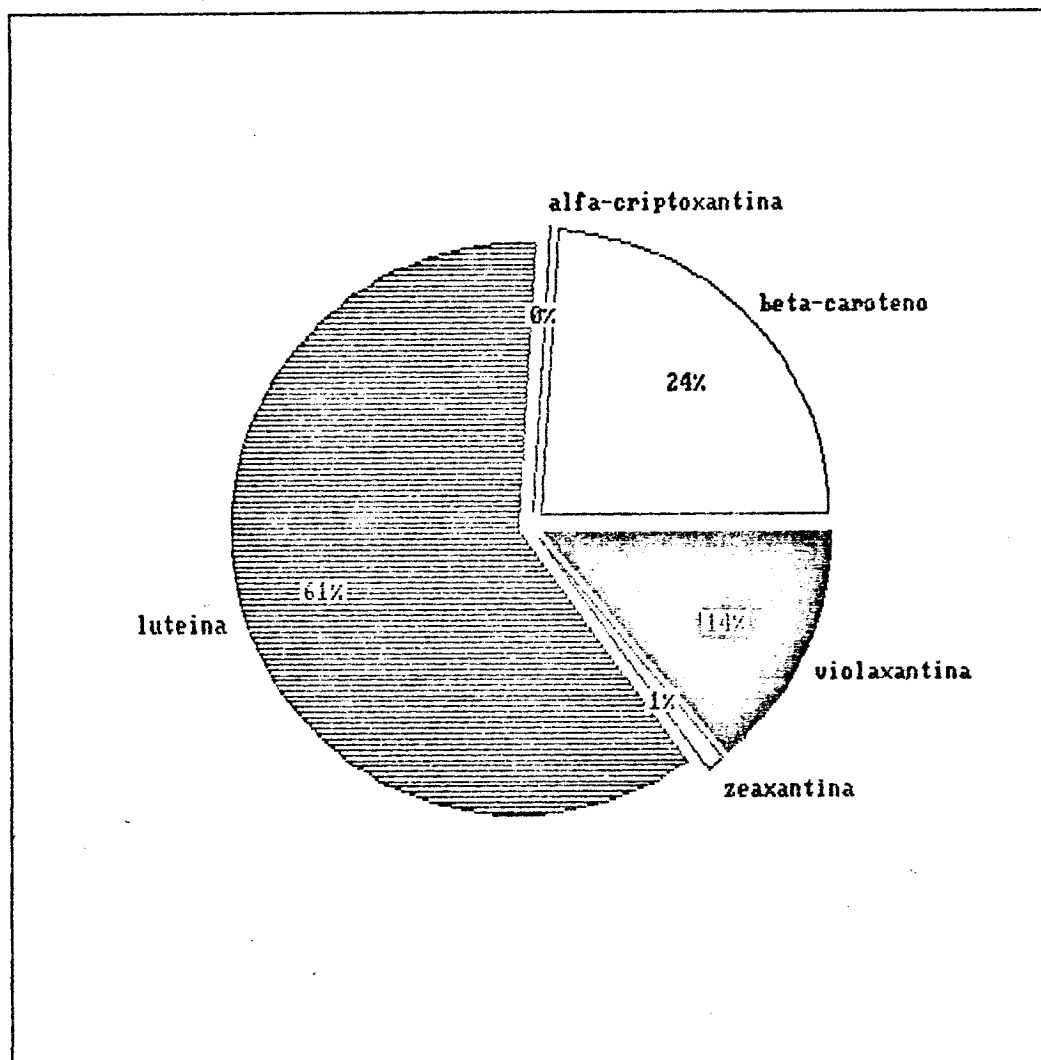


FIGURA 20: Distribuição dos carotenóides em taioba.

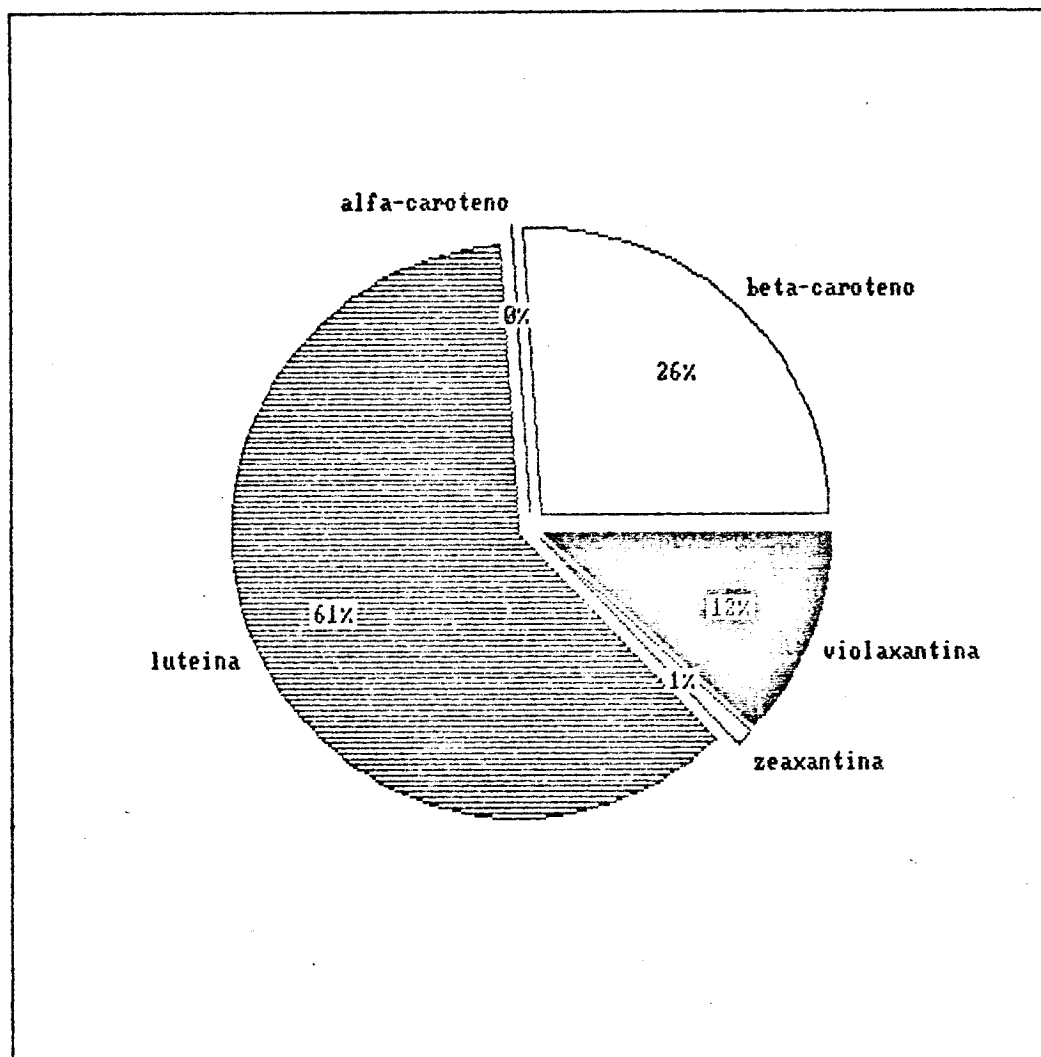


FIGURA 21: Distribuição dos carotenóides em serralha.

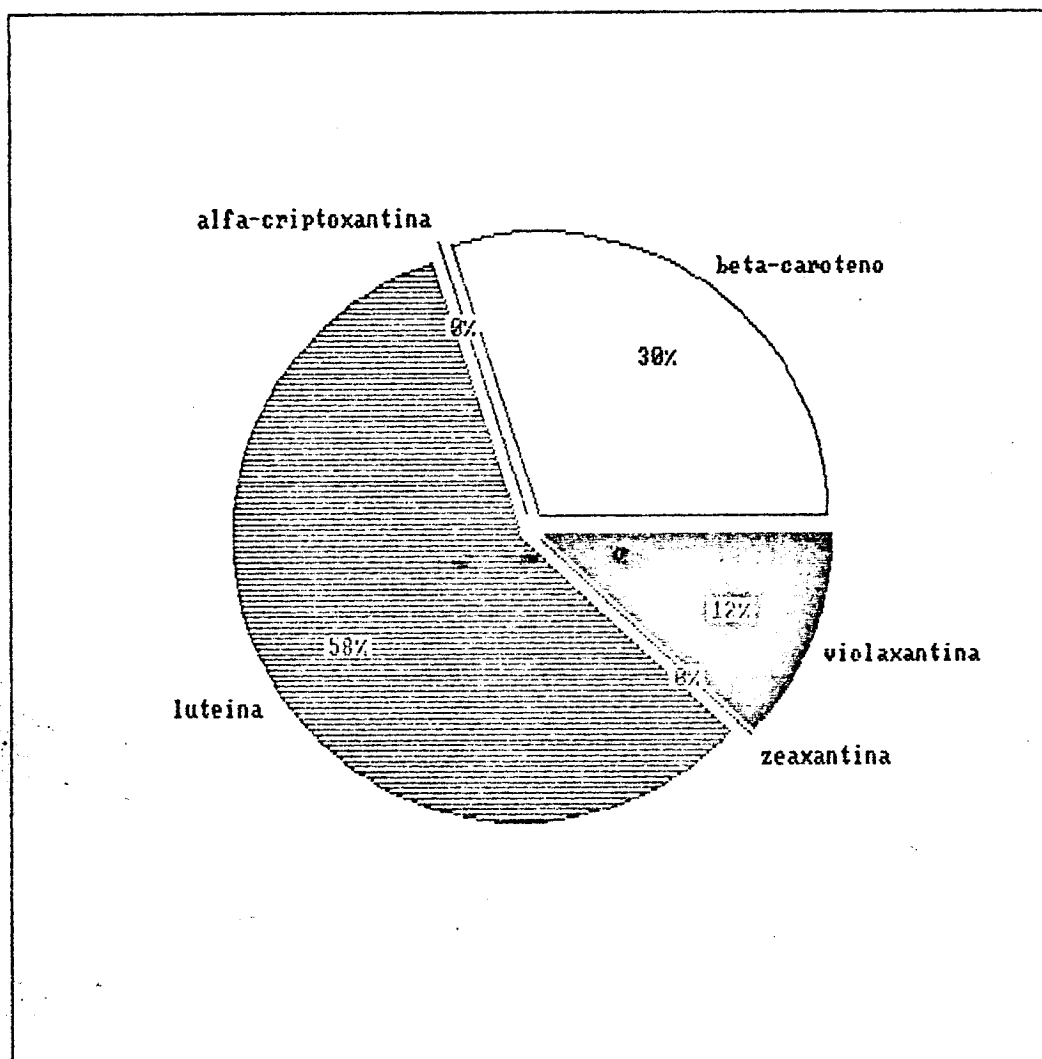


FIGURA 22: Distribuição dos carotenóides em beldroega.

TABELA 11: Composição de carotenóides em caruru (*Amaranthus viridis* L.).

| CAROTENÓIDES            | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |               |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------|---------------|
|                         | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA         |
| $\beta$ -caroteno       | 109,85                                        | 5,58  | 102,08-115,74 |
| $\alpha$ -criptoxantina | 1,33                                          | 1,24  | traços- 2,55  |
| luteína                 | 236,97                                        | 49,56 | 186,23-299,14 |
| zeaxantina              | 8,20                                          | 6,52  | traços- 16,85 |
| violaxantina            | 42,34                                         | 4,56  | 37,81- 49,37  |
| total                   | 398,68                                        | 48,79 | 345,64-466,74 |

1: Resultado de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

D.P.: Desvio padrão

TABELA 12: Composição de carotenóides em mentruz (*Lepidium pseudodidymum* Thell.)

| CAROTENÓIDES            | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |               |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------|---------------|
|                         | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA         |
| $\beta$ -caroteno       | 84,65                                         | 19,11 | 66,45-116,54  |
| $\alpha$ -criptoxantina | -----                                         | ----- | N.D.-traços   |
| luteína                 | 163,46                                        | 49,56 | 141,96-220,35 |
| zeaxantina              | 0,96                                          | 2,15  | N.D.- 4,80    |
| violaxantina            | 34,59                                         | 5,67  | 27,82- 42,57  |
| total                   | 283,65                                        | 55,75 | 236,23-379,47 |

1: Resultado de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.



TABELA 13: Composição de carotenóides em taioba (*Colocasia esculenta* L.).

| CAROTENÓIDES            | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |               |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------|---------------|
|                         | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA         |
| $\beta$ -caroteno       | 67,32                                         | 20,89 | 46,90- 91,41  |
| $\alpha$ -criptoxantina | 0,96                                          | 1,37  | N.D.- 2,96    |
| luteína                 | 171,91                                        | 37,98 | 135,75-216,25 |
| zeaxantina              | 2,71                                          | 6,05  | traços- 13,52 |
| violaxantina            | 40,20                                         | 10,91 | 25,33- 52,09  |
| total                   | 283,09                                        | 63,20 | 224,08-359,76 |

1: Resultado de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

TABELA 14: Composição de carotenóides em serralha (*Sonchus oleraceus* L.).

| CAROTENÓIDES            | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |               |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------|---------------|
|                         | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA         |
| $\beta$ -caroteno       | 62,86                                         | 13,82 | 41,66- 80,02  |
| $\alpha$ -criptoxantina | 0,29                                          | 0,64  | N.D.- 1,43    |
| luteína                 | 144,72                                        | 51,84 | 73,58-204,93  |
| zeaxantina              | 3,11                                          | 5,66  | traços- 13,04 |
| violaxantina            | 28,03                                         | 5,97  | 20,21- 34,92  |
| total                   | 239,00                                        | 69,31 | 148,05-332,91 |

1: Resultado de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

TABELA 15: Composição de carotenóides em beldroega (*Portulaca oleracea* L.).

| CAROTENÓIDES            | CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> |       |              |
|-------------------------|-----------------------------------------------|-------|--------------|
|                         | MÉDIA                                         | D.P.  | FAIXA        |
| $\beta$ -caroteno       | 29,79                                         | 8,20  | 24,76- 44,23 |
| $\alpha$ -criptoxantina | 0,59                                          | 0,82  | traços- 1,66 |
| luteína                 | 48,20                                         | 7,50  | 35,00- 53,72 |
| zeaxantina              | 0,67                                          | 1,50  | N.D. - 3,36  |
| violaxantina            | 9,10                                          | 1,78  | 7,46- 12,11  |
| total                   | 88,36                                         | 13,38 | 71,32-108,83 |

1: Resultado de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

D.P.: Desvio padrão; N.D.: Não detectado.

total de carotenóides foi de 11, 12, 14, 12 e 10% em caruru, mentruz, taioba, serralha e beldroega, respectivamente (Figuras 18, 19, 20, 21 e 22).

O caruru apresentou o maior teor de carotenóides totais, seguido de mentruz, taioba, serralha e beldroega (Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15).

É interessante notar que as folhas brasileiras diferem da composição geral relatada no exterior em dois pontos: 1-a presença de  $\alpha$ -criptoxantina ao invés de  $\beta$ -criptoxantina; e 2-a concentração bem reduzida de neoxantina, que geralmente é encontrada em teores maiores que a zeaxantina.

No levantamento feito por Ramos & Rodriguez-Amaya (1987) em verduras folhosas mais consumidas no estado de São Paulo, foram obtidos teores de  $\beta$ -caroteno que diminuíram na seguinte ordem: salsinha, rúcula, coentro, agrião, couve, almeirão, chicória, alface crespa e lisa, repolho e couve chinesa. Das verduras folhosas analisadas no presente trabalho, o caruru superou o teor de  $\beta$ -caroteno da salsinha cerca de duas vezes, o mentruz foi cerca de uma vez e meia maior, enquanto que a taioba e serralha tiveram valores semelhantes ao da salsinha. Já a beldroega que apresentou o menor teor de  $\beta$ -caroteno das verduras nativas analisadas, ainda assim teve um valor maior que almeirão, chicória, alface crespa e lisa, repolho, couve e couve chinesa.

Gomez (1981), no Quênia, também encontrou maiores teores de  $\beta$ -caroteno em 15 verduras folhosas nativas do que nas cultivadas (couve, repolho e alface).

Na Índia, Begum & Pereira (1977) analisaram 32 verduras folhosas verdes nativas e os teores de  $\beta$ -caroteno variaram entre 73 e 11,80  $\mu\text{g/g}$ . Portanto o caruru e o mentruz, nativas brasileiras, ainda apresentaram maiores valores de  $\beta$ -caroteno.

Além de  $\beta$ -caroteno, Penteado et al. (1986) encontraram pequena quantidade de  $\alpha$ -caroteno (50% de atividade de vitamina A) em hortaliças folhosas consumidas no Norte do Brasil.

Os valores de vitamina A, obtidos pelos autores acima, das verduras mentruz, taioba e beldroega foram menores que os obtidos no presente trabalho. Embora utilizando a mesma metodologia, a obtenção de maiores teores neste estudo pode ser devido à vários fatores: 1-efeito geográfico (Sudeste/Nordeste); 2-os carotenóides, neste trabalho, foram extraídos no mesmo dia em que foi feita a coleta de amostras, enquanto Penteado et al. mantiveram as verduras sob refrigeração num prazo máximo de uma semana; e 3-a eliminação de saponificação, etapa que pode acarretar perdas de carotenóides.

Gomez (1981), Begum & Pereira (1977) e Penteado et al. (1986) não determinaram a composição completa de carotenóides.

Os dados obtidos neste trabalho mostram o alto valor de vitamina A das verduras nativas brasileiras (Tabela 16) e, portanto o seu cultivo comercial deve ser incentivado, uma vez que a deficiência de vitamina A é considerada um sério problema nutri-

TABELA 16: Valor de vitamina A das cinco verduras folhosas nativas

| VERDURAS  | VALOR DE VITAMINA A <sup>1</sup> |            |
|-----------|----------------------------------|------------|
|           | RE/100g                          | UI/100g    |
| caruru    | 1838,1± 89,2                     | 18381± 892 |
| mentruz   | 1410,8±367,8                     | 14108±3678 |
| taioaba   | 1123,0±341,4                     | 11230±3414 |
| serralha  | 1050,0±231,2                     | 10500±2312 |
| beldroega | 499,3±142,7                      | 4993±1427  |

1: Média e desvio padrão de 5 amostras coletadas em épocas diferentes.

cional no país. Cabe lembrar ainda que o cultivo dessas verduras é mais fácil que o daquelas introduzidas do exterior.

## 5. CONCLUSÕES

1. O método de RODRIGUEZ et al. (fase normal) foi mais versátil, podendo ser usado para qualquer tipo de alimento e também proporcionou melhor separação dos carotenóides na coluna. Dos três métodos, foi o único que permitiu a determinação da composição completa de carotenóides.
2. Em ambos métodos de FASE REVERSA, a determinação de pró-vitaminas A foi restrita a alimentos que não possuem licopeno.
3. Dos três métodos comparados, o de SIMPSON et al. foi o que obteve a pior performance, pois, além do maior tempo e custo de análise ainda proporcionou resultados mais baixos de  $\beta$ -caroteno que os outros dois métodos.
4. Houve diferença significativa entre as cultivares manteiga e tronchuda. Os teores de  $\beta$ -caroteno e valor de vitamina A foram significativamente maiores e o de zeaxantina menor na couve tronchuda tanto no inverno como no verão. O conteúdo de luteína, violaxantina e total de carotenóides foi significativamente maior na cultivar tronchuda, mas só de verão.



5. A composição também variou significativamente em função da estação do ano. Nas duas cultivares de couve, o  $\beta$ -caroteno, valor de vitamina A e zeaxantina apresentaram-se maiores no inverno. Os teores de luteína e total de carotenóides foram também significativamente maiores na couve manteiga no inverno. Já a violaxantina teve um maior teor na cultivar tronchuda de verão.

6. O uso de defensivos agrícolas mudou significativamente a composição de carotenóides. Os teores dos carotenóides foram significativamente maiores na couve proveniente da horta natural.

7. As verduras folhosas nativas brasileiras apresentaram altos teores de  $\beta$ -caroteno (e conseqüentemente altos valores de vitamina A), luteína, violaxantina e total de carotenóides.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B. N. 1983. Oxygen radicals and degenerative diseases.  
Science 221: 1256.

AOAC. 1984. " Official Methods of Analysis of the Association of  
Official Analytical Chemists". 14 th ed., (Ed.) S. Williams, p  
834-835. Association of Official Analytical Chemists Inc.,  
Arlington.

ARIMA, H. K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1988 (a). Carotenoid  
composition and vitamin A value of Brazilian squashes and  
pumpkins. J. Micronutr. Anal. 4: 177.

ARIMA, H. K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1988 (b). Carotenoid  
composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from  
northeastern Brazil. ( Enviado à Arch. Latinoamer. Nutr.).

BAUERNFEIND, J. C. 1972. Carotenoid vitamin A precursors and  
analogs in foods and feeds. J. Agric. Food Chem. 20: 456.

- BECKMANN, E. O. 1976. Important constituents of carrots as affected by changes in soil quality. Indust. Obst Gemueseév. 61: 126. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1977. 9: 2J 149.
- BECKMANN, E. O. & PESTEMER, W. The influence of herbicide treatment on yield and composition of carrots with different organic manuring. 1975. Landwirt. Forsc. 28: 41. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1977. 9: 8J 1098.
- BEECHER, G. R. & KHACIK, F. 1984. Evaluation of vitamin A and carotenoid data in food composition tables. J. Nat. Cancer Inst. 73: 1397.
- BEGUM, A. & PEREIRA, S. M. 1977. The beta carotene content of indian edible green leaves. Trop. Geogr. Med. 29: 47.
- BHAGAT, P., SAIMBHI, M. S., SHARMA, B. N. & YASHPAUL. 1976. Effect of some herbicides on chemical composition of carrot root (*Daucus carota* L.). J. Res. Punjab Agric. Univ. 13: 202. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1977. 9: 8J 1099.

- BLATTNA, J., KRCOVA, H. & BLATTNY, C. 1976. Study of the composition of some carrot cultivars from different areas. I. Content of  $\beta$ -carotene. Sborn. Vysoke Skoly Chem.-Technol. Praze 45: 87. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1977. 2: 6J 850.
- BOOTH, V. H. 1957. Carotene in the leaves of the carrot. J. Sci. Food Agric. 8: 371.
- BRAUMANN, T. & GRIMME, L. H. 1981. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. Biochim. Biophys. Acta 637: 8.
- BRUBACHER, G., MULLER-MULOT, W. & SOUTHGATE, D. A. T. 1985. Carotene in foodstuffs. Em "Methods for determination of vitamins in foods". p33-50. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- BUREAU, J. L. & BUSHWAY, R. J. 1986. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. J. Food Sci., 51 : 128.
- BURGER, M., HEIN, L. W., TEPLY, L. J., DERSE, P. H. & KRIEGER, C. H. 1956. Vitamin, mineral and proximate composition of frozen fruits, juices and vegetables. Agric. Food Chem., 4: 418.

- BURTON, G. W. & INGOLD, K. U. 1984.  $\beta$ -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569.
- BUSHWAY, R. J. 1985. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 8 : 1527.
- BUSHWAY, R. J. 1986. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 409.
- BUSHWAY, R. J. & WILSON, A. M. 1982. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in fruit and vegetables by HPLC. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15: 165.
- BUSHWAY, R. J., YANG, A. & YAMANI, A. M. 1986. Comparison of alpha- and beta-carotene content of supermarket versus roadside stand produce. *J. Food Qual.* 9: 437.
- CECCHI, H. M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1981 (a). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew- apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *J. Food Sci.* 46 : 147.

- CECCHI, H. M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1981 (b). Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. Ciênc. e Cult., 33 : 72.
- CHANDLER, L. A. & SCHWARTZ, S. J. 1987. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. J. Food Sci., 52 : 669.
- COLDITZ, G. A., BRANCH, L. G., LIPNICK, R. J., WILLET, W. C., ROSNNER, B., POSNER, B. M. & HENNEKENS, C. H. 1985. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population. J. Am. Clin. Nutr. 41: 32.
- CONSTANTIN, R. J., JONES, L. G. & HERNANDEZ, T. P. 1975. Sweet potato quality as affected by soil reaction (pH) and fertilizer. J. Am. Soc. Hort. Sci. 100: 604. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1976. 8: 8J 1347.
- DAVIES, B. H. 1976. Carotenoids. Em "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", 2nd ed., (Ed.) T. W. Goodwin, p 38-165. Academic Press, London.
- DOVKIN, E., PERSHAKOVA, N. & KOSTIN, V. 1984. Quality improvement of pasta products. Mukom.-elevat. Kombik. Promys. 7, 6. Citado em " Food Science and Techonology Abstracts". 1985. 17: 7M 60.

- ESKINS, K., SCHOLFIELD, C. R. & DUTTON, H. J. 1977. High-performance liquid chromatography of plant pigments. J. Chromatogr. 135: 217.
- FARROW, R. P., KEMPER, K. & CHIN, H. B. 1979. Natural variability in nutrient content of California fruits and vegetables. Food Technol. 33: 52.
- FELLERS, C. R. & BUCK, R.E. 1941. Retention of vitamins C and A in glass-packed foods. Food Res. 6: 135.
- FIKSALH, A., MORTENSEN, J. T. & LIAANSEN-JENSEN, S. 1978. High pressure liquid chromatography of carotenoids. J. Chromatogr. 157: 111.
- FITZGERALD, G. A. & FELLERS, C. R. 1938. Carotene and ascorbic acid content of fresh market and commercially frozen fruits and vegetables. Food Res. 3: 109.
- FRACZEK, T., BUBICZ, M. & GROCHOWSKI, M. 1977. Contents of carotenes,  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid in celery. 1977. Przem. Spoz. 31: 438. Citado em "Food Science and Technology Abstracts". 1978. 10: 6J 764.

- FRANCO, G. 1982. "Nutrição Texto básico e tabela de composição química dos alimentos". 6th ed. Livraria Ateneu, Rio de Janeiro.
- GODDARD, M. S. & MATTHEWS, R. H. 1979. Current knowledge of nutritive values of vegetables. Food Technol. 33: 71.
- GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1988. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. Lebensm. Wiss. Technol. (no prelo).
- GOMEZ, M. I. 1981. Carotene content of some green leafy vegetables of Kenia and effects of dehydration and storage on carotene retention. J. Plant Foods 3: 231.
- GOODRICH, R. M., PARKER, R. S., LISK, D.J. & STOEWESAND, G. S. 1988. Gluconisolate, carotene and cadmium content of Brassica oleracea grown on Municipal sewage sludge. Food Chem. 27: 141.
- GOODWIN, T. W. 1976. Distribution of carotenoids. Em "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". 2nd ed. (Ed.) T.W. Goodwin, p 225-257. Academic Press, London.
- GOODWIN, T. W. 1966. The carotenoids. Em "Comparative Phytochemistry". (Ed.) T. Swain, p121-137. Academic Press, London.



- GROSS, J. 1980. A rapid separation of citrus carotenoids by thin-layer chromatography. *Chromatogr.* 13: 572.
- GROSS, J., GABAI, M. & LIFSHITZ, A. 1971. Carotenoids in juice of Shamouti orange. *Phytochem.*, 12 : 2259.
- GROSS, J., GABAI, M., LIFHITZ, A. & SKLARZ, B. 1973. Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. *Phytochem.* 12: 2259.
- HABBen, J. 1973. Quality constituents of carrots *Daucus carota* L. as influenced by nitrogen and potassium fertilization. *Acta Hort.* 29: 295.
- HEYWOOD, R., PALMER, A. K., GREGSON, R. L. & HUMMLER, H. 1985. The toxicity of beta-caroteno. *Toxicol.* 36: 91.
- HIRAYAMA, O. & OIDO, H. 1969. Changes of lipid and pigment composition in spinach leaves during storade. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 43: 423.
- HSIEH, Y. P. C. & KAREL, M. 1983. Rapid extration and determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes in foods. *J. Chromatogr.* 259: 515.

- IRIYAMA, K., YOSHIURA, M. & SHIRAKI, M. 1978. Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using HPLC. *J. Chromatogr.* 154: 302.
- IRIYAMA, K., YOSHIURA, M., SHIRAKI, M, YANO, S. & SAITO, S. 1980. An improved method for the rapid and easy separation of leaf pigments and their derivatives by thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* 106: 322.
- JAVOR, T., BATA, M., LAVASZ, L., MORAN, F., NAGY, L., PATTY, I., SZABOKS, J., TARNOK, F., TOTH, G. & MOZSIK, G. 1983. Gastric cytoprotective effects of vitamin A and other carotenoids. *Int. J. Tissue React.*, 5 : 289.
- KHACHIK, F., BEECHER, G. R. & WHITTAKER, N. F. 1986. Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 603.
- KIMURA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA. 1983. Cultivar differences, geographic effects and influence of exogenous ethylene on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. Trabalho apresentado no 8th International Symposium on Carotenoids, Boston.p 60.

- KLAUI, H. & BAUERNFEIND, J. C. 1981. Carotenoids as food color. Em "Carotenoid as Colorants and Vitamin A Precursors. (Ed.) J. C. Bauernfeind. p 48-289. Academic Press, New York.
- KLEIN, B. P. & PERRY, A. K. 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. J. Food Sci. 47: 941.
- KRINSKY, N. I. 1971. Function. Em "Carotenoids". (Ed.) O. Isler. p669-716. Birkhausser Verlag Basel, Stuttgart.
- LEE, C. Y. 1986. Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. Food Chem., 20 : 285.
- MATHEWS-ROTH, M. M. 1981. Carotenoids in medical applications. Em "Carotenoids as Colorant and Vitamin A Precursors". (Ed.) J. C. Bauernfeind. p 755-781. Academic Press, New York.
- MATHEWS-ROTH, M. M. 1982. Antitumor activity of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and phytoene. Oncology 39: 33.

- MATHEWS-ROTH, M. M. 1985. Carotenoids and cancer prevention-  
experimental and epidemiological studies. Pure Appl. Chem.  
57:717.
- NAC-NRC. 1980. Recommended dietary allowances. 9 th ed. p 55-71.  
National Academy of Sciences, Washington; D.C.
- NELIS, H. J. C. F. & LEENHEER, A. P. 1983. Isocratic nonaqueous  
reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. Anal.  
Chem. 55: 270.
- OBERLEY, L. W. & BUETTNER, G. R. 1979. Role of superoxide  
dismutases in cancer: A review. Cancer Res. 39: 1141.
- PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1986. Characterisation of the  
carotenoids and assesment of the vitamin A value of brasilian  
guavas (*Psidium guajava* L.). Food Chem., 20 : 11.
- PENTEADO, M. V. C., MINAZZI, R. S. & ALMEIDA, L. B. 1986.  
Carotenóides e atividade pró-vitamnica A de folhas de  
hortaliças consumidas no norte do Brasil. Rev. Farm. Bioquim.  
Univ. S. Paulo 22: 97.

- PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J. D. & SPORN, M. P. 1981. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer? *Nature* 290: 201.
- QUACKENBUSH, F. W. 1987. Reverse phase HPLC separation of cis and trans carotenoids and its application to  $\beta$ -carotenes in food materials. *J. Liq. Chromatogr.*, 10 : 643.
- RAMOS, D. M. R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1987. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. *J. Micronutrients Anal.*, 3 : 147.
- RAO, C. N. 1967. True vitamin A value of some vegetables. *J. Nutr. Diet.* 4: 10.
- REEDER, S. K. & PARK, G. L. 1975. A specific method for determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58: 595.
- RODRIGUEZ, D. B., RAYMUNDO, L. C., LEE, T. C., SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. 1976 (a) . Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.*, 40 : 615.
- RODRIGUEZ, D. B., TANAKA, Y., KATAYAMA, T., SIMPSON, K. L., LEE, T. C. & CHICHESTER, C. O. 1976 (b) . Hydroxylation of  $\beta$ -carotene on Micro-Cel C. *J. Agric. Food Chem.* 24: 819.

- RODRIGUEZ, R. S. M. 1988. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A de hortaliças folhosas e suas alterações com o cozimento. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, São Paulo.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1985. Os carotenóides como precursores de vitamina A. Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim. 19:227.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1988. Critical review of provitamin A determination in plant foods. (enviado à J. Micronutr. Anal.).
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. 1983. Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit *Cyphomandia betacea*. Food Chem. 12: 61.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., KIMURA, M., GODOY, H. T. & ARIMA, H. K. 1988. Assesment provitamin A determination by open column chromatography-visible absorption spectrophotometry. J. Chromatogr. Sci. 26: 624.
- ROUCHAUD, J., MOONS, C. & MEYER, J. A. 1984. Effects of pesticide treatments on the carotenoid pigments of lettuce. J. Agric. Food Chem. 32: 1241.

- ROUCHAUD, J., MOONS, C. & MEYER, J. A. 1985. The effects of selected herbicide and fungicide treatments on the carotenes and xanthophylls in lettuce. J. Hort. Sci., 60 : 245.
- RUEDI, P. 1985. HPLC- A powerful tool in carotenoid research. Pure Appl. Chem. 57: 793.
- SADOWSKI, R. & WOJCIK, W. 1983. Chromatography of chloroplast carotenoids on magnesium oxide thin layers. J. Chromatogr. 262: 455.
- SALMINEN, K., KARINPAA, A., KOIVISTOINEN, P. & MUKULA, J. 1970. Postharvest chemistry of carrots as such and modified by pre-harvest use of herbicides chlorpropham (CIPC) and linuron. Acta Agric. Scand. 20: 49.
- SHEKELLE, R. B., LIU, S., RAYNOR, W. J., LEPPER, M., MALIZA, C., ROSSOF, A. H., PAUL, O., SHRYOCK, A. N. M. & STAMLER, J. 1981. Dietary vitamin a and risk of cancer in the western electric study. Lancet 2: 8257.
- SIMPSON, K. L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. Proc. Nutr. Soc. 42: 7.

- SIMPSON, K. L., ABDULAY, A. & TSAI, S. W. 1987. A reverse phase separation of  $\beta$ -carotene and vitamin A in foods. Trabalho apresentado no 8th International Symposium on Carotenoids. Boston p. 16.
- SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. 1981. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. Ann. Rev. Nutr. 1: 351.
- SIMPSON, K. L., TSOU, S. C. S. & CHICHESTER, C. O. 1985. Carotenes. Em "Methods of Vitamin Assay". 4th ed., (Ed.) J. Augustin, B. P. Klein, D. Becker & P. B. Venugopal. p 185-220. John Wiley & Sons, New York.
- SOOD, R. & BHAT, C. M. 1974. Changes in ascorbic acid and carotene content of green leafy vegetables on cooking. J. Food Sci. Tech. 11: 131.
- SPEEK, A. J., SPEEK-SAICHUA, S. & SCHREURS, W. H. P. 1988. Total carotenoids and  $\beta$ -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. Food Chem. 27: 245.
- SPEEK, A. J., TEMALILWA, C. R. & SCHRIJVER, J. 1986. Determination of  $\beta$ -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. Food Chem. 19: 65.



- STEWART, I. 1977 (a). Provitamin A carotenoid content of citrus juice. J. Agric. Food Chem. 25: 1132.
- STEWART, I. 1977 (b). High performance liquid chromatography determination of provitamin A carotenoids in orange juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 132.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1970. Separation of carotene stereoisomers in vegetables. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53 : 937.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1971 (a). Effects of selected herbicides on provitamin A content of vegetables. J. Agric. Food Chem., 19 : 854.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. 1971 (b). Effect of processing on provitamin A in vegetables. J. Am. Diet. Assoc. 59: 238.
- TAKAGI, S. 1985. Determination of green leaf carotenoids by HPLC. Agric. Biol. Chem. 49: 1211.
- TAN, C. T. & FRANCIS, F. J. 1962. Effect of processing temperature on pigments and color of spinach. J. Food Sci. 27: 232.

- TANAKA, Y., KATAYAMA, T., SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. 1981. Stability of carotenoids on silica gel and other adsorbents. Citado por SIMPSON, K. L., TSOU, S. C. S. & CHICHESTER, C. O. 1985. Carotenes. Em "Methods of Vitamin Assay". 4th. ed. (Ed.) J. Augustin, B. P. Klein, D. Becker & P. B. Venugopal. p 185-220. John Wiley & Sons, New York.
- VALADON, L. R. G. & MUMMERY, R. S. 1981. Effect of canning and storage on carotenoids (vitamin A activity) and vitamin C in spanish and turkish oranges. J. Sci. Food Agric. 32: 737.
- VENTER, F. 1979. Nitrate contents in carrots (*Daucus carota* L.) as influenced by fertilization. Acta Hort. 93: 163.
- VEREECKE, M. & MAERCKE, D. Y. 1979. Subtractive fertilization experiment on carrots (*Daucus carota* L.) in relation to soil- and leaf analysis, yied and quality. Acta Hort. 93: 197.
- WHITTINGHAM, C. P. 1976. Function in photosynthesis. Em "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments". 2nd ed., (Ed.) T.W. Goodwin, p 624-654. Academic Press, London.
- ZAKARIA, M., SIMPSON, K., BROWN, P. R. & KRSTULOVIC, A. 1979. Use of reverse-phase high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. J. Chromatogr. 176: 109.

ZECHMEISTER, L. 1970. Cis-trans isomeric carotenoids. Em:

BAUERNFEIND, J. C. 1972. Carotenoid vitamin A precursors and  
analogues in foods and feeds. J. Agric. Food Chem., 20 : 456.

## ANEXO I

Família Amaranthaceae

*Amaranthus viridis* L.

caruru-de-mancha, caruru-verde, bredo, caruru

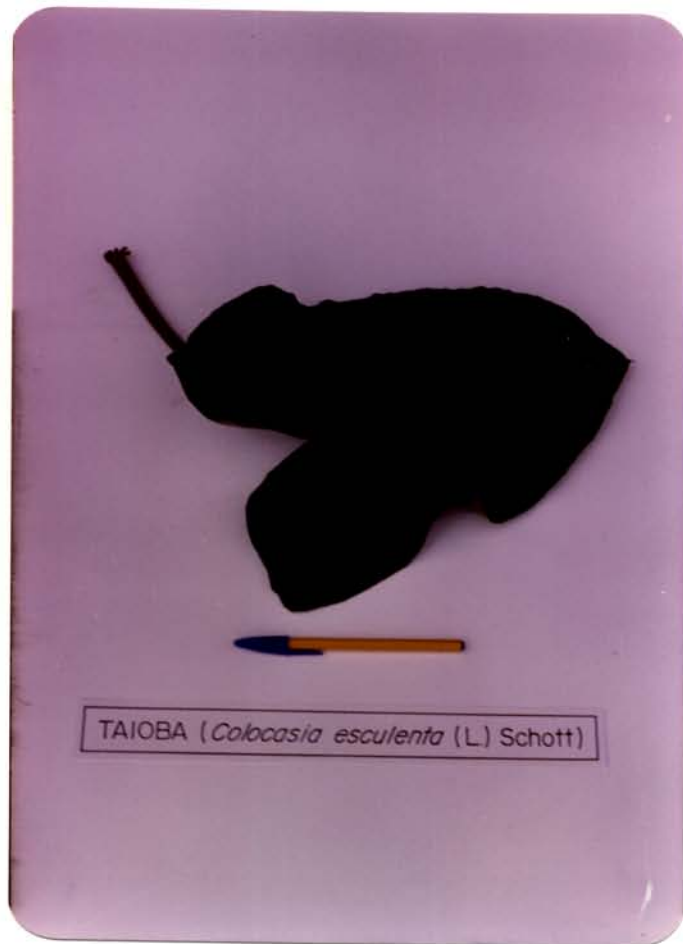


ANEXO II

Família Cruciferae  
*Lepidium pseudodidymum* Thell.  
mastruço mentruz



ANEXO III



ANEXO IV



ANEXO V

Familia Portulacaceae

*Portulaca oleracea* L.

beldroega, bredo-de-porco, verdolaga, ora-pro-nobis

