

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE DE MESTRADO

**“Determinação de Isômeros Geométricos de Alguns  
Carotenóides Provitamínicos A por Cromatografia  
Líquida de Alta Eficiência”**

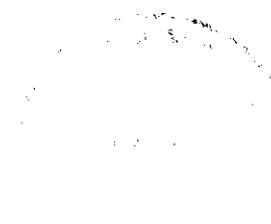
Cássia Regina Limonta Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins



Campinas, São Paulo

1996



UNIDADE	IG
N. CHAMADA	T/UNICAMP
V.	29/05/96
PREÇO	R\$ 11,20
DATA	02/11/96
N. CPD	03.00093.234.4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

C253d Carvalho, Cássia Regina Limonta  
Determinação de isômeros geométricos de alguns carotenóides provitamínicos A por cromatografia líquida de alta eficiência / Cássia Regina Limonta Carvalho. -- Campinas. [SP : s.n.], 1996.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Carotenóides. 2. Isômeros geométricos. 3. Separação por CLAE. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

Carvalho, Cassia Regina Limonta

Determinação de isômeros geométricos de alguns carotenóides provitamínicos A por cromatografia líquida de alta eficiência / UNICAMP/C253d

(29059/96)

Dedico este estudo aos iniciantes no  
tema "carotenóides".

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins, meu especial agradecimento pela valiosa orientação e principalmente pela sua paciência, permitindo assim, a conclusão deste estudo.

Ao ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, por permitir, com apoio e auxílio, o desenvolvimento prático do estudo.

Ao Instituto Agrônomo e à Seção de Fitoquímica por possibilitarem a realização da parte descritiva do trabalho.

À EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Kenneth Elmer Collins (IQ/UNICAMP) pelos empréstimos de fases estacionárias e pelo auxílio no recheio das colunas cromatográficas.

À Profa. Dra. Délia B. Rodriguez-Amaya (FEA/UNICAMP) pelo apoio dado, oferecendo uma das fases estacionárias usadas neste trabalho.

Ao pesquisador Fernando Picarelli Martins e aos motoristas da Estação Experimental de Jundiaí do Instituto Agrônomo, que gentilmente forneceram amostras de pêssego.

À pesquisadora Vera Lúcia S. Baldini (ITAL) por auxiliar-me nas leituras espectrofotométricas, durante as identificações das substâncias.

À Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (FEA/UNICAMP) pelo fornecimento de muitas referências bibliográficas.

Ao Paulo R. Nogueira Carvalho (ITAL) (pesquisador e meu marido) que sempre tem se mostrado um companheiro.

Aos pesquisadores Dr. Eidiomar Angelucci (ITAL/SENAI) e Iovaldo B. Figueiredo (ITAL/*in memoriam*) por serem os responsáveis pela minha iniciação neste caminho.

Aos colegas da ex-Seção de Glícidés (ITAL), Dilza M. Bassi Mantovani, Roberto M. Moraes e demais, pelo incentivo e apoio.

À Renata Bisson Ercoline e Cláudia Aparecida da Silva pelo auxílio, não só no desenvolvimento deste estudo, mas também de muitos outros.

Enfim, sintam aqui agradecidos todos àqueles que contribuíram para o meu crescimento profissional.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Histórico sobre os carotenóides.....	3
2.2 Estruturas dos carotenóides.....	5
2.3 Biossíntese.....	8
2.4 Classificação dos carotenóides.....	15
2.5 Atividade biológica.....	23
2.6 Nomenclatura dos carotenóides.....	26
2.7 Conversão dos carotenóides para vitamina A.....	45
2.8 Absorção e fatores influenciáveis.....	54
2.9 Unidades assumidas para expressar e estimar a atividade vitamina A em alimentos.....	60
2.10 Metodologia analítica.....	64
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1 Matéria-prima.....	71
3.2 Equipamentos.....	71
3.3 Vidraria.....	72
3.4 Reagentes.....	72

3.5	Colunas cromatográficas.....	72
3.6	Padrões analíticos.....	73
3.7	Métodos.....	74
3.7.1	Sistemas cromatográficos estudados (I Etapa).....	74
3.7.2	Análise de carotenóides em amostras de alimentos, utilizando coluna de hidróxido de cálcio (II Etapa).....	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.1	Avaliação de diferentes fases estacionárias (I Etapa).....	79
4.1.1	Coluna com grupo funcional octadecil (C <sub>18</sub> ).....	79
4.1.2	Coluna com grupo funcional nitrila (CN).....	81
4.1.3	Coluna com grupo funcional amina (NH <sub>2</sub> ).....	82
4.1.4	Coluna de óxido de alumínio (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....	82
4.1.5	Coluna de hidróxido de cálcio (Ca(OH) <sub>2</sub> ).....	86
4.2	Padronização das condições da coluna de hidróxido de cálcio para análise de alimentos.....	89
4.3	Análise de carotenóides em amostras de alimentos.....	94
5	CONCLUSÃO.....	111
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
	ANEXO.....	124

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Classificações de alguns carotenóides.....	22
TABELA 2 - Atividade vitamínica A de alguns carotenóides.....	25
TABELA 3 - Bioatividade relativa dos isômeros geométricos de carotenóides provitamínicos A em ratos, determinada por alguns autores .....	27
TABELA 4 - Proporções da atividade real de $\beta$ -caroteno e retinol para alguns animais.....	62
TABELA 5 - Resultados das análises químicas e físico-químicas das amostras estudadas.....	98
TABELA 6 - Carotenóides provitamina A encontrados nas amostras avaliadas no estudo.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Fórmulas estruturais do licopeno (acíclica) e do $\beta$ -caroteno (bicíclica). Estruturas tetraterpênicas com oito unidades isoprênicas.....	6
FIGURA 2 - Arranjo espacial na forma <i>cis</i> : (a) sem impedimento estérico; (b) com impedimento estérico.....	8
FIGURA 3 - Estruturas do $\beta$ -caroteno na configuração <i>cis</i> .....	9
FIGURA 4 - Comparação das fórmulas estruturais de alguns carotenóides, encontrados em alimentos, com a estrutura do licopeno.....	10
FIGURA 5 - Representação sumária da biossíntese dos carotenóides.....	12
FIGURA 6 - Mecanismo de formação dos anéis $\beta$ , $\gamma$ e $\epsilon$ .....	14
FIGURA 7 - Fórmulas estruturais de alguns carotenóides de ocorrência natural derivados de carotenóides $C_{40}$ .....	16
FIGURA 8 - Fórmulas estruturais de alguns carotenóides de ocorrência natural, classificados de acordo com os átomos presentes em suas moléculas.....	17
FIGURA 9 - Fórmulas estruturais da vitamina A em suas várias formas como retinóides.....	20
FIGURA 10 - Estrutura acíclica $C_{40}H_{56}$ .....	29
FIGURA 11 - Designação e numeração dos grupos finais.....	30
FIGURA 12 - Desenho da estrutura e numeração de um carotenóide...	31
FIGURA 13 - Fórmulas estruturais de nor-carotenóides.....	31
FIGURA 14 - Carotenóides com mudanças dos níveis de hidrogenação.....	32
FIGURA 15 - Grupo final modificado ou degradado o qual receberá a designação $\beta$ por este corresponder ao grupo final que primeiro integra a ordem alfabética grega.....	33
FIGURA 16 - Fórmula estrutural de um seco-carotenóide.....	33
FIGURA 17 - Carotenóide oxigenado derivado de hidrocarboneto carotenóide.....	35

FIGURA 18 - Denominação de um carotenóide oxigenado com função éter.....	35
FIGURA 19 - Derivados oxigenados com função éter (epóxidos).....	36
FIGURA 20 - Compostos derivados de hidrocarbonetos carotenóides com adição de elementos de água e metanol.....	36
FIGURA 21 - Numeração de um carotenóide oxigenado com grupos finais desiguais.....	37
FIGURA 22 - 2' - Metóxi - $\epsilon, \epsilon$ - caroten - 3 - ona.....	37
FIGURA 23 - 2' - Metóxi - $\epsilon, \epsilon$ - caroteno - 2, 3' - diona e não 2 - Metóxi - $\epsilon, \epsilon$ - caroteno - 3, 2' - diona ( 2, 3' < 3, 2' ).....	38
FIGURA 24 - 3, 2' - Dimetóxi - 1, 2, 5', 6' - tetraidro - $\psi, \psi$ - caroteno e não 2, 3' - Dimetóxi - 1', 2', 5, 6 - tetraidro - $\psi, \psi$ - caroteno (a série 1, 2, 3, 2', 5', 6' é menor que a série 2, 5, 6, 1', 2', 3').....	39
FIGURA 25 - a) 3- Hidróxi - 6', 7 - <i>retro</i> - $\beta, \epsilon$ - caroten - 3' -ona; b) 6', 7 - <i>retro</i> - $\epsilon, \kappa$ - Caroten - 3 -ona.....	39
FIGURA 26 - a) 2' - Apo - $\beta, \psi$ - caroten - 2' -al; b) Dimetil - 6, 6' - diapocaroteno - 6, 6' - dioato ( <i>trans</i> - Metilbixina); c) 3 - Hidróxi - 8' - apo - $\beta$ - caroten - 8' - al.....	40
FIGURA 27 - Carotenóides superiores.....	42
FIGURA 28 - (3 R, 3' R) - $\beta, \beta$ - caroteno - 3, 3' diol.....	42
FIGURA 29 - (3'S, 5'R, 6'R) - 3' - Acetóxi - 5, 6 - epóxi - 3, 5' - dihidróxi - 6', 7' - didesidro - 5, 6, 7, 8, 5', 6' - hexaidro - $\beta, \beta$ - caroten - 8 - ona.....	42
FIGURA 30 - a) 13 - <i>cis</i> - $\beta, \beta$ - caroteno; b) 15 - <i>cis</i> - 7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12' - octaidro - $\psi, \psi$ - caroteno.....	44
FIGURA 31 - Conversão de $\beta$ - caroteno para retinol pela clivagem simétrica.....	46
FIGURA 32 - Conversão do $\beta$ - caroteno para retinol pela clivagem assimétrica.....	49
FIGURA 33 - Esquema do metabolismo da vitamina A no corpo animal. Adaptado de PITT (1971). RCH <sub>2</sub> OH = retinol, RCH <sub>2</sub> OCOR' = ésteres de retinila, RCH <sub>2</sub> OG = $\beta$ - glicuronato de retinila, RCHO = retinal, RCOOH = ácido retinóico, RCOOG = $\beta$ - glicuronato de retinoila, RBP = retinol ligado à proteína.....	52

- FIGURA 34 - Desenho esquemático dos elementos da absorção e digestão das gorduras..... 53
- FIGURA 35 - Esquema do metabolismo de conversão do  $\beta$ -caroteno para vitamina A e para estruturas oxicarotenóides em animais marinhos, semelhante ao metabolismo de aves..... 57
- FIGURA 36 - Separação e identificação de isômeros geométricos de  $\beta$ -caroteno por cromatografia em coluna aberta, com hidróxido de cálcio como fase estacionária e soluções com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (30 - 60°C). F1 = 13-*cis*- $\beta$ -caroteno; F2 = *trans*- $\beta$ -caroteno; F3 = *trans*- $\beta$ -caroteno + 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. A separação por CLAE foi realizada em coluna de hidróxido de cálcio com fase móvel de n-hexano em sistema isocrático a uma vazão de 0,5 mL/min..... 75
- FIGURA 37 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química usando sistema isocrático de eluição; (c) após isomerização química, usando sistema gradiente de eluição. Fase móvel: metanol e acetona. Coluna C<sub>18</sub>..... 80
- FIGURA 38 - Estudo do efeito da temperatura na resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno. Coluna RP-18 com fase móvel de metanol e acetona (70:30) a uma vazão de 1,0 mL/min..... 81
- FIGURA 39 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química, usando sistema isocrático de eluição com n-hexano e uma vazão de 0,5 mL/min. Coluna CN..... 83
- FIGURA 40 - Cromatogramas obtidos com o uso de coluna NH<sub>2</sub> para separação de isômeros de  $\beta$ -caroteno, com as fases móveis e vazões: (a) iso-octano com uma vazão de 0,5 mL/min.; (b) iso-octano e n-hexano (50:50) com uma vazão de 0,5 mL/min.; (c) n-hexano com uma vazão de 1,0 mL/min.; (d) n-hexano e acetona (80:20) com uma vazão de 1,0 mL/min.; (e) n-hexano e acetona (50:50) com uma vazão de 1,0 mL/min. e (f) n-hexano e acetona (30:70) com uma vazão de 0,5 mL/min..... 84

- FIGURA 41 - Cromatogramas (CLAE) de uma solução de  $\beta$ -caroteno após isomerização, utilizando sistema isocrático de eluição a uma vazão de 0,5 mL/min. de: (a) n-hexano; (b) n-hexano e diclorometano (50:50); (c) n-hexano e diclorometano (20:80); (d) diclorometano; (e) n-hexano e iso-octano (95:5) e (f) iso-octano. Coluna de óxido de alumínio..... 85
- FIGURA 42 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno após isomerização química, usando sistema isocrático de eluição com (a) n-hexano e com (b) iso-octano. Coluna  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ..... 87
- FIGURA 43 - Estudo do efeito da temperatura na resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno. Coluna  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com fase móvel de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min..... 88
- FIGURA 44 - Curva de calibração de  $\alpha$ -caroteno..... 90
- FIGURA 45 - Curva de calibração de  $\beta$ -caroteno..... 91
- FIGURA 46 - Curva de calibração de  $\beta$ -criptoxantina..... 92
- FIGURA 47 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b), bidimensional (c) e espectro de absorção (d) de  $\beta$ -criptoxantina antes de isomerização química e cromatogramas planar (e) e bidimensional (f) após isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), a uma vazão de 0,5 mL/min..... 93
- FIGURA 48 - Cromatogramas tridimensionais de  $\alpha$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição isocrática de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min..... 96
- FIGURA 49 - Cromatogramas tridimensionais de  $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição isocrática de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min..... 97

- FIGURA 50 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b), bidimensional (c) e espectros de absorção (d) dos picos cromatográficos, com tempos de retenção de 6,04 minutos ( $\alpha$ -Caroteno), 10,72 minutos (*trans*- $\beta$ -Caroteno), 9,75 minutos (13-*cis*- $\beta$ -Caroteno) e 13,20 minutos (9-*cis*- $\beta$ -Caroteno), da amostra de azeite de dendê utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca(OH)}_2$  com eluição isocrática de iso-octano a uma vazão de 0,5 mL/min..... 102
- FIGURA 51 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de pêssigo utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca(OH)}_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Os pigmentos identificados foram:  $\beta$ -caroteno (9,84 min.) e  $\beta$ -criptoxantina (29,28 min.)..... 105
- FIGURA 52 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de laranja utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca(OH)}_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Carotenóides provitamínicos identificados:  $\alpha$ -caroteno (5,76 min.); 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (8,64 min.); *trans*- $\beta$ -caroteno (9,84 min.) e  $\beta$ -criptoxantina (34,80 min.)..... 107
- FIGURA 53 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de moranga utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca(OH)}_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Carotenóide provitamínico identificado:  $\beta$ -caroteno (8,28 min.)..... 110

**“Determinação de Isômeros Geométricos de Alguns Carotenóides  
Provitamínicos A por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”**

Candidata: Cássia Regina Limonta Carvalho<sup>1</sup>

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Seção de Fitoquímica, Instituto Agronômico  
Cx. P. 28, 13020-902 Campinas - SP, Brasil  
Fone: 55 (019) 2415188 - R. 420 Fax: 55 (019) 2423602

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas  
Cx. P. 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil  
Fone: 55 (019) 2397642 Fax: 55 (019) 2393805

## RESUMO

A separação de isômeros geométricos de carotenóides provitamínicos, cujas presenças podem influir na concentração vitamínica A dos alimentos, tem sido objeto de vários estudos e de muita discussão. Este estudo procurou avaliar a eficiência de diferentes condições cromatográficas na separação destes pigmentos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, colunas com sílica derivada com grupos funcionais octadecil (C<sub>18</sub>), nitrila (CN) e amina (NH<sub>2</sub>), colunas de óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e diferentes sistemas de fases móveis. A coluna de C<sub>18</sub> utilizada neste estudo não demonstrou eficiência na separação dos isômeros geométricos do β-caroteno, confirmando que apenas algumas unidades de marcas específicas possuem este atributo. O melhor desempenho foi conseguido com a coluna de hidróxido de cálcio com dois sistemas de fases móveis: isocrático, com iso-octano ou n-hexano, para amostras que apresentem apenas α- e β-carotenos como carotenóides provitamínicos, e gradiente, com uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), para amostras que também contenham β-criptoxantina. Estas condições foram testadas em análises de amostras de alimentos como azeite de dendê, pêssego, laranja e moranga. Destes, somente azeite de dendê (19,56 mg/100g de *trans*-β-caroteno e quantidades mensuráveis de α- e *cis*-β-caroteno) e moranga (0,90 mg/100g de *trans*-β-caroteno) apresentaram quantidades significantes de β-caroteno. No azeite de dendê o cálculo da atividade vitamínica pode ser superestimado em até 8% quando não são consideradas, em separado, as atividades de cada isômero geométrico do β-caroteno.

## “Determination of Geometric Isomers of Some Provitamin A Carotenoids for High Performance Liquid Chromatography”

Candidate: Cássia Regina Limonta Carvalho<sup>1</sup>

Supervisor: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Seção de Fitoquímica, Instituto Agronômico  
Cx. P. 28, 13020-902 Campinas - SP, Brazil  
Phone: 55 (019) 2415188 - R. 420 Fax: 55 (019) 2423602

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas  
Cx. P. 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brazil  
Phone: 55 (019) 2397642 Fax: 55 (019) 2393805

### ABSTRACT

The separation of the geometric isomers of provitaminic carotenoids, whose presence may influence the concentration of vitamin A in some foodstuffs, has been the subject of various studies and much discussion. This project evaluated the efficiency of several different chromatographic conditions for the separation of these substances, using high performance liquid chromatography with diode array detection, columns packed with silica containing octadecyl, nitrile or amino functionalization, columns of alumina or calcium hydroxide and different systems of mobile phases. The C<sub>18</sub> column used was not effective, suggesting that only certain C<sub>18</sub> columns possess characteristics to permit geometrical isomer separation. The best result was obtained with the calcium hydroxide column using two different elution programs: isocratic with iso-octane or n-hexane, for samples containing only  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotenes, and a gradient initially at 100% iso-octane and moving to iso-octane-acetone (80:20) over a one hour period, for samples which also contain  $\beta$ -cryptoxanthin. These analytical conditions were tested on samples of dende oil, peaches, orange juice and yellow squash. Of these, only palm oil (19.56 mg/100g of *trans*- $\beta$ -carotene with smaller amounts of  $\alpha$ - and *cis*- $\beta$ -carotenes) and squash (0.90 mg/100g of *trans*- $\beta$ -carotene) had significant quantities of the provitamins. For palm oil, the vitaminic activity could be overestimated by 8% if the provitaminic activities of the separated isomers is not considered.

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais presentes na maioria dos tecidos vegetais e encontrados também no reino animal. A importância conferida a esses pigmentos se deve, tanto pela sua característica corante como pela participação nutricional, através de sua transformação em vitamina A no organismo animal.

A relação dos carotenóides com a vitamina A e a evidência de que apenas algumas das estruturas apresentam esta propriedade, gerou um grande número de trabalhos nessa área, principalmente no estudo da distribuição desses pigmentos nos alimentos.

O progresso da cromatografia se confunde com o avanço dos estudos dos carotenóides, onde esta técnica analítica é objeto comum dos mais variados trabalhos realizados nessa área. Tswett, entre 1900 e 1911, inventou a cromatografia em coluna para separar pigmentos como clorofilas, xantofilas e carotenos de folhas (ISLER, 1971). A primeira separação de carotenóides com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência é atribuída a Stewart e Wheaton que, em 1971, a utilizaram para a separação de uma mistura complexa de carotenóides em extratos de citros (RÜEDI, 1985; PFANDER *et al.*, 1994).

Ao discorrer sobre o tema carotenóides, sua complexidade é observada em vários aspectos, tais como: grande número de compostos de estruturas semelhantes; vários compostos presentes em uma única matriz; grandes variações na atividade provitamina A, devido às mínimas diferenças nas estruturas moleculares e associadas aos vários fatores influenciáveis na absorção destas substâncias; possibilidade de apresentar inúmeros isômeros geométricos pela alta labilidade dos carotenóides e devido ao sistema cromóforo presente na moléculas. Enfim, estas características peculiares dificultam a separação, identificação e quantificação dos pigmentos.

Apesar da complexidade dos carotenóides, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência na separação e quantificação de carotenóides provitamínicos A em alimentos tem aumentado muito, nos últimos anos, apresentando um progresso significativo, tornando-a uma poderosa técnica analítica, especialmente quando acompanhada de monitoramento pelo detector de arranjo de fotodiodos, acoplado a computador.

Observa-se, contudo, que na etapa de separação dos pigmentos carotenóides é notória a não preocupação com os isômeros geométricos presentes que, pela diferença de suas atividades vitamínicas, podem potencializar os valores vitamínicos das amostras estudadas.

Assim, este trabalho teve como objetivo, em uma primeira etapa, avaliar a eficiência de várias fases estacionárias, utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência, na separação de isômeros geométricos de  $\beta$ -caroteno e, em uma segunda etapa, aplicar as melhores condições encontradas, para o estudo analítico dos carotenóides provitamínicos A em algumas amostras complexas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico sobre os carotenóides

Os carotenóides compreendem uma classe de hidrocarbonetos denominados carotenos e seus derivados oxigenados chamados xantofilas (IUPAC-IUB, 1975). São pigmentos de coloração amarela a vermelha, amplamente distribuídos nos reinos vegetal e animal, podendo ser encontrados em fungos e bactérias e até em tecidos fotossintéticos de vegetais e não fotossintéticos (flores, frutas, sementes, raízes) (SIMPSON e CHICHESTER, 1981), bem como em tecidos de animais superiores (órgãos de reprodução, soro do sangue, peles e penas, gema do ovo, leite) (DEUEL, 1951; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; BRITTON, 1992).

Aproximadamente 600 estruturas de carotenóides naturais foram elucidadas, dentre as quais perto de 20 destas substâncias estão presentes em alimentos, enquanto que a maior parte é encontrada em fungos, bactérias e algas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; OLSON, 1989).

O reconhecimento dos carotenóides como compostos químicos deu-se por volta de 1831, a partir do isolamento e identificação de um pigmento de cenoura (*Daucus carota* L.) por Wackenroder que o batizou *carotin*, posteriormente chamado de *caroteno* (DEUEL, 1951). Anos depois, em 1837, o termo xantofila foi descrito por Berzelius com o estudo de pigmentos amarelos em folhas, visíveis após a degradação da clorofila, durante a estação de outono (TAYLOR, 1983). Já a designação carotenóides e sua subdivisão em carotenos e xantofilas foram propostas por Tswett, em 1911, incluindo nessa terminologia todas as substâncias genéricas e quimicamente relacionadas com o primeiro composto descoberto (*carotin*) (DEUEL, 1951).

O interesse sobre os carotenóides cresceu com a revelação da existência de uma relação entre esses compostos e a vitamina A, contribuindo para o aumento de trabalhos nessa área, embora tenham sido descobertos muito antes da vitamina A. Por fazerem parte da natureza, com a característica de conferir cor aos tecidos (portanto visíveis) e estarem bem distribuídos, os carotenóides tiveram suas identificações antecipadas em relação à vitamina A.

Pelos relatos de DEUEL (1951) a ação que levou ao conhecimento da vitamina A foi gerada em 1912, após 80 anos da data de reconhecimento dos carotenóides, quando Hopkins desenvolveu um trabalho pioneiro sobre a possível existência da vitamina A. Neste trabalho o autor demonstrou que ratos não cresciam normalmente com uma dieta básica, ausente de alimentos naturais e composta de nutrientes purificados como proteínas, carboidratos, gorduras e minerais. Para obter o crescimento normal dos ratos era necessário a adição de suplementos conhecidos como *accessory food factors* em suas alimentações.

Ainda segundo DEUEL (1951), em pesquisas seguintes ficou demonstrado que uma das substâncias do suplemento alimentar tratava-se de uma fração encontrada em algumas gorduras, denominada pelos pesquisadores de *fat-soluble accessory factor*. Mais tarde, esta nomenclatura foi substituída, por Drummond, pelo termo vitamina A. No entanto, verificou-se, em 1922, que essa fração não era constituída de uma única substância, mas sim de duas vitaminas (A e D). Conseqüentemente, a expressão vitamina A passou a representar substâncias relacionadas com o crescimento e fator antixerofitálmico (anti-egueira), e vitamina D as substâncias relacionadas com a prevenção de raquitismo (fator anti-raquítico).

Desse modo, e a partir de estudos das atividades biológicas dos pigmentos, chegou-se à evidência da inter-relação entre os carotenóides e a vitamina A. Steenbock e co-autores, de 1919 a 1922, já haviam relacionado, em vários trabalhos, os pigmentos carotenóides amarelos com a vitamina A. Porém, a

relação tornou-se clara, quando von Euler e colaboradores, em 1929, demonstraram a superação da deficiência de vitamina A (restabelecimento do crescimento) em ratos, oferecendo aos mesmos, cristais puros de carotenos isolados de cenoura. Moore, em 1930, estabeleceu definitivamente a transformação do caroteno em vitamina A, aplicando testes com gordura de fígado de ratos, nos quais foram administrados vitamina A ou caroteno. Nestes testes a reação era positiva para a reação vitamina A (reação com tricloreto de antimônio com intensa coloração azul), enquanto que testes com a gordura de fígado de ratos desprovidos de vitamina A não desenvolvia a característica coloração. Outro fato importante foi que o composto resultante da transformação biológica e presente no fígado apresentava a mesma absorção máxima da vitamina A na região ultravioleta (328 nm), confirmando assim que no organismo animal o caroteno podia se converter, uma vez que este pigmento não exibia a mesma absorção específica da vitamina A naquela região (DEUEL, 1951; ISLER, 1971).

A primeira estrutura a ser estudada, dentre os carotenóides, foi a do  $\beta$ -caroteno<sup>1</sup> por ser um dos mais distribuídos na natureza e pela facilidade de sua isolamento. Assim, com as elucidações das fórmulas estruturais do  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ) e da vitamina A ( $C_{20}H_{29}OH$ ), em 1931 por Karrer *et al.*, pode-se observar as similaridades entre as estruturas (Figuras 1 e 9), sendo a vitamina A a metade da molécula do  $\beta$ -caroteno, com a adição de uma molécula de água (ISLER, 1971).

## 2.2 Estruturas dos carotenóides

As estruturas básicas dos carotenóides apresentam-se nas formas de cadeias alifáticas ou cadeias mistas (alifáticas-alicíclicas), constituindo para os carotenóides com 40 átomos de carbonos de oito unidades isoprênicas<sup>2</sup>. Todavia, dependendo do número de átomos de carbono presentes na molécula,

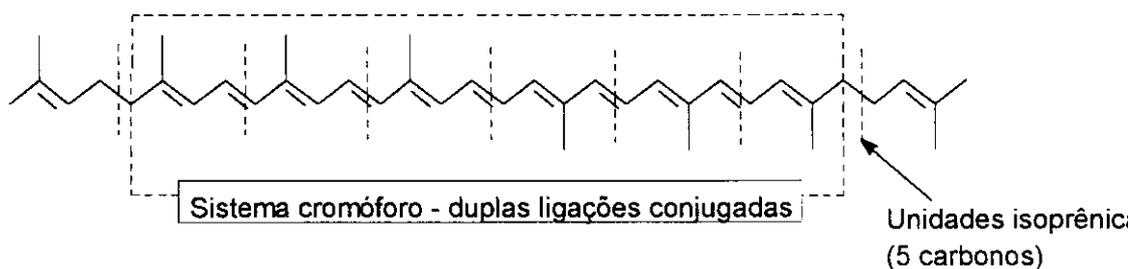
---

<sup>1</sup> De acordo com as "Recomendações IUPAC - IUB 1974", os nomes triviais dos carotenóides, em uma primeira menção, devem vir acompanhados dos nomes semi-sistemáticos na forma de rodapé ou entre parênteses. Entretanto neste trabalho, os nomes triviais com seus respectivos nomes semi-sistemáticos são indicados no ANEXO I.

<sup>2</sup> Unidades compostas por cinco átomos de carbono.

as unidades isoprênicas podem variar em maior ou menor número. Na molécula, estas unidades seguem a chamada regra do isopreno, onde os grupos metilas extremos (ramificações - CH<sub>3</sub>) se situam na posição 1:5 (ligação cabeça-cauda), tendo como exceção as ligações dos grupos metilas centrais da molécula, localizadas na posição 1:6 (ligação cauda-cauda) (NOBILE, 1962; BAUERNFEIND, 1972). Muitas estruturas são simétricas, isto é, as duas metades da molécula são idênticas, possuindo reversão do plano de simetria no centro da molécula, o que, segundo DAVIES (1976), indica sua rota de biossíntese. A pigmentação dos carotenóides é devida à presença de um sistema cromóforo na molécula (Figura 1), constituído por uma série de duplas ligações conjugadas (NOBILE, 1962; BAUERNFEIND, 1972).

a) Cadeia alifática



b) Cadeia alifática-alicíclica

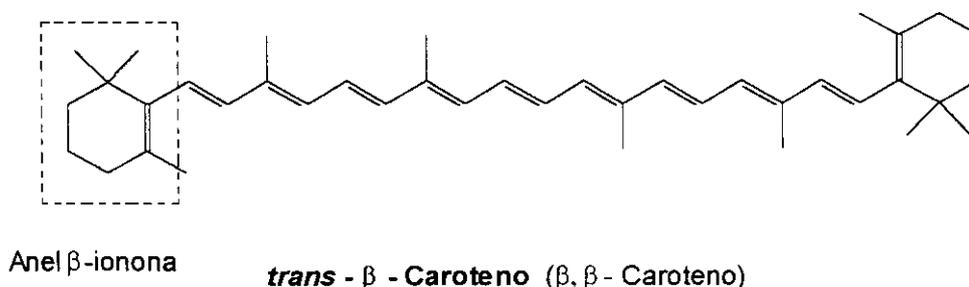


FIGURA 1 - Fórmulas estruturais do licopeno (acíclica) e do β-caroteno (bicíclica). Estruturas tetraterpênicas com oito unidades isoprênicas.

Por terem maior estabilidade na natureza, as configurações geométricas dos carotenóides apresentam-se em maiores proporções nas formas *todo-trans* (Figuras 1 e 4), embora também existam naturalmente as formas *cis* (DEUEL, 1951; GODOY, 1985). Alguns carotenos como o  $\gamma$ -caroteno, licopeno e  $\zeta$ -caroteno, são encontrados particularmente em frutas nas formas *poli-cis* (DAVIES, 1976).

As possibilidades de mudanças das configurações são devidas ao alto grau de insaturação dos carotenóides. Sob condições ideais (aquecimento, baixa acidez e luz) ocorre isomerização em uma ou mais duplas ligações da estrutura molecular com formação de uma mistura de isômeros, na qual geralmente predomina a forma *trans*. O número de isômeros teoricamente possíveis de um carotenóide está relacionado com o número de duplas ligações existentes e com a simetria estrutural da molécula. Se for simétrica (as duas metades idênticas) o número de isômeros possíveis diminui. Apenas uma dupla ligação de cada unidade isoprênica ( $C_5$ ) na parte alifática da cadeia está disponível ao rearranjo espacial por não apresentar impedimento estérico. Desta forma, somente aquelas duplas ligações que contêm átomos de hidrogênio sobre os dois átomos de carbono adjacentes aos carbonos unidos pela dupla ligação assumem a configuração *cis* (Figura 2-a). Como exemplo, o  $\beta$ -caroteno por possuir nove duplas ligações na parte alifática da cadeia e apresentar a estrutura simétrica, teoricamente poderia ter 272 isômeros. Mas, pelo motivo de que algumas destas duplas ligações estarem impedidas estericamente (impedimento estérico entre os átomos de hidrogênio e os grupos metilas substituintes dos átomos de carbono adjacentes aos carbonos que compõem a dupla ligação - Figura 2-b), a estrutura passa a possuir apenas cinco duplas ligações não impedidas (duplas ligações 9, 13, 15, 13' e 9'). Assim, diminuindo o número de duplas ligações estericamente eficazes no  $\beta$ -caroteno, o número possível de isômeros geométricos passa a vinte (Figura 3) (DEUEL, 1951; DAVIES, 1976). Dados semelhantes são encontrados para o licopeno, onde de onze duplas ligações (1056 isômeros

teóricos) passa a ter sete duplas ligações não impedidas, que podem gerar 72 isômeros geométricos.

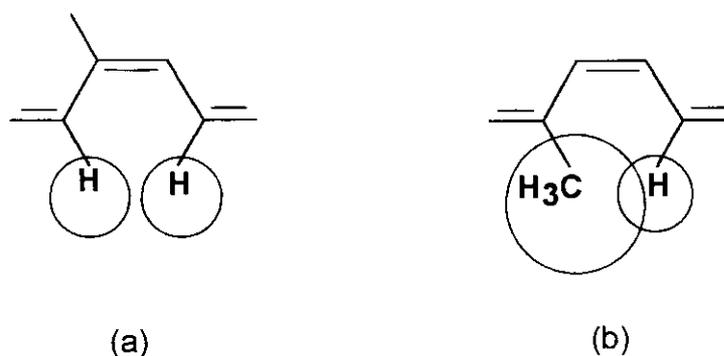


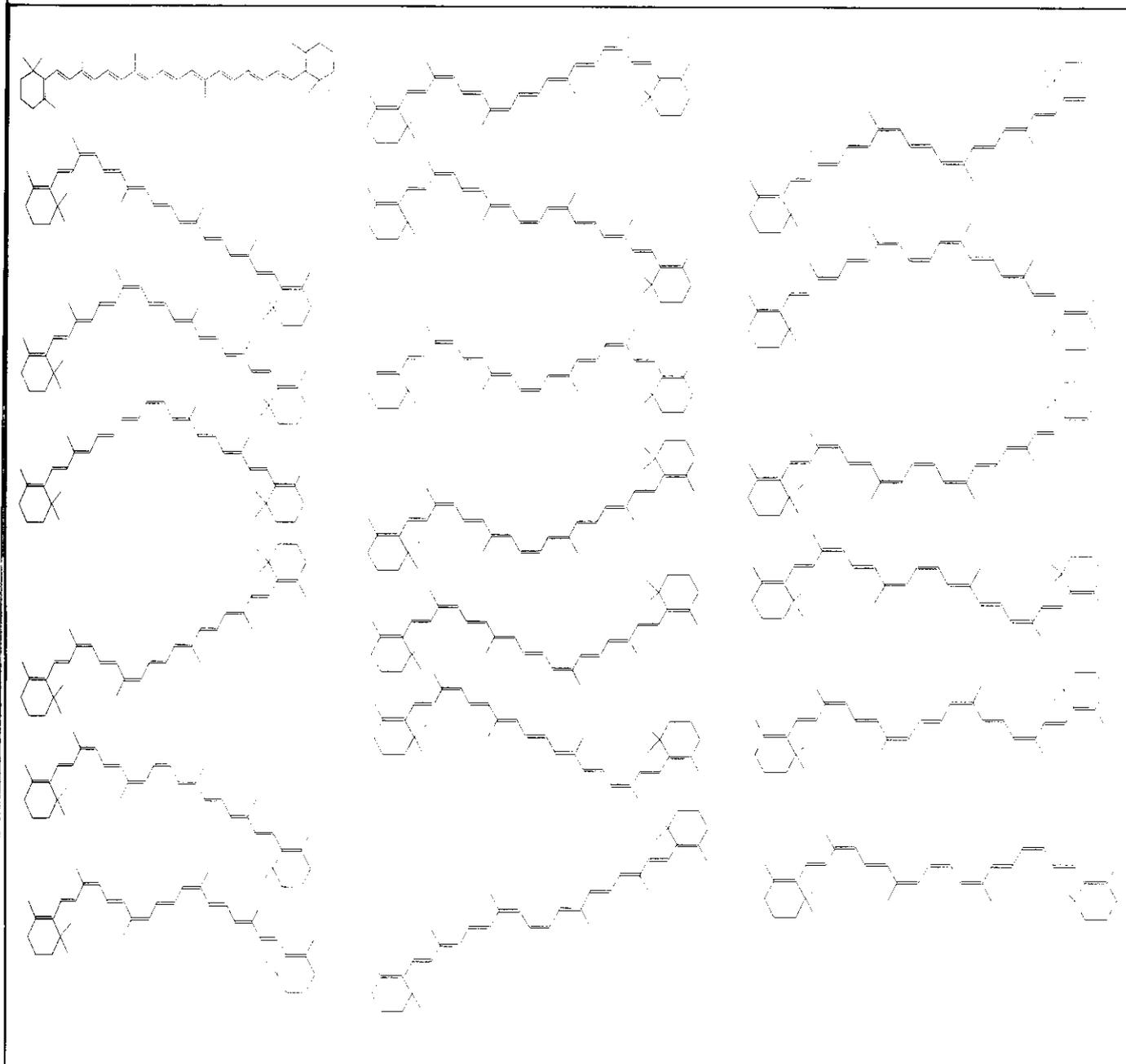
FIGURA 2 - Arranjo espacial na forma *cis*: (a) sem impedimento estérico; (b) com impedimento estérico.

Pela definição de NOBILE (1962), todos os carotenóides conhecidos são considerados substâncias "parentes" do licopeno (pigmento predominante no tomate) já que suas estruturas se assemelham. Observando a molécula do licopeno, as estruturas podem ser obtidas por meio de modificações químicas em que ocorre ciclização dos grupos metilas finais da cadeia com combinação dos processos de introdução de outros grupos funcionais, migração de uma determinada dupla ligação, oxidação da molécula e perda de unidades isoprênicas (Figura 4).

### 2.3 Biossíntese

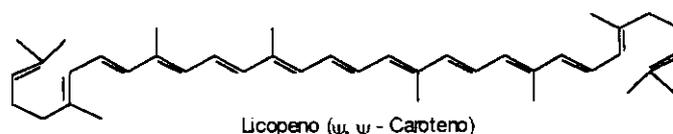
Os carotenóides não são sintetizados pelos humanos e outros mamíferos, nem pelos animais como aves, peixes e invertebrados. Estes seres são capazes de absorverem, no intestino, na forma integral, parte dos carotenóides ingeridos em suas dietas. Após suas circulações pelo organismo, por serem lipossolúveis, são depositados nos tecidos adiposos ou sob pequenas modificações (oxidação terminal, no caso de aves, peixes e invertebrados) são transformados em

pigmentos típicos destes animais, conferindo assim, coloração a alguns tecidos (GOODWIN, 1954; PETO *et al.*, 1981; WOLF, 1982; GODOY, 1985 e SPEEK *et al.*, 1986).

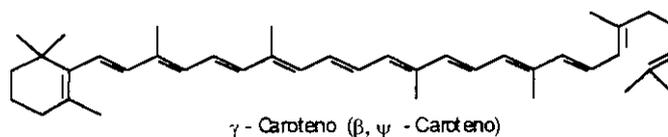


Referência: DEUEL (1951).

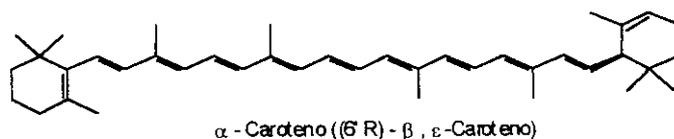
FIGURA 3 - Estruturas do  $\beta$ -caroteno na configuração *cis*.



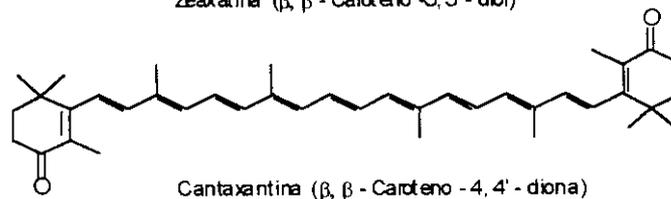
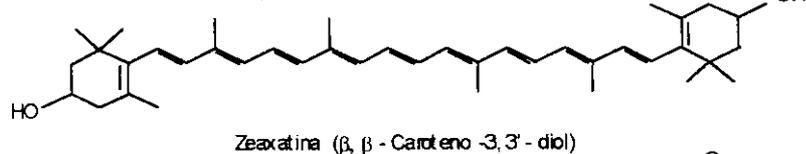
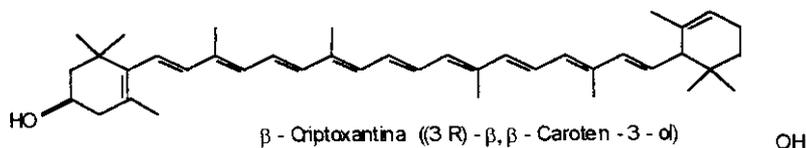
**Ciclização**



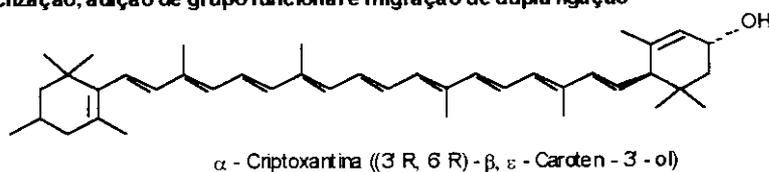
**Ciclização e migração de uma determinada dupla ligação**



**Ciclização e adição de grupos funcionais**



**Ciclização, adição de grupo funcional e migração de dupla ligação**



**Ciclização e oxidação**

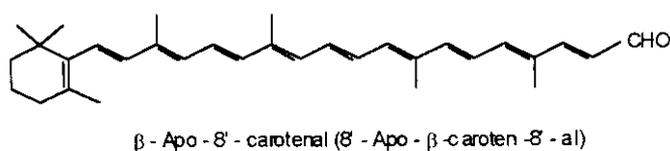


FIGURA 4 - Comparação das fórmulas estruturais de alguns carotenóides, encontrados em alimentos, com a estrutura do licopeno.

Na realidade, podem ser sintetizados tanto por organismos autotróficos<sup>3</sup> (na maioria, organismos fotossintéticos que conseguem construir, a partir do dióxido de carbono requerido do meio ambiente, todas as suas biomoléculas), como também, por alguns organismos heterotróficos<sup>4</sup>. Desta forma, são sintetizados em plantas superiores, algas, bactérias fototróficas e cianobactérias e em alguns fungos e bactérias não-fotossintéticas, formando na maior parte estruturas tetraterpênicas (C<sub>40</sub>) (GOODWIN, 1971; BRITTON, 1988).

A Figura 5 demonstra a representação sumária da biossíntese dos carotenóides baseada nos esquemas propostos por BAUERNFEIND (1972) e por BRITTON (1988). O processo de formação das cadeias passa por vários caminhos, compartilhando no início os mesmos estágios de formação dos terpenóides, até atingir as etapas de formações restritas aos carotenóides (estágios posteriores à formação do composto difostato de geranylgeranila - C<sub>20</sub>). Pode-se dizer que o anabolismo dos carotenóides inicia-se com os grupos acetato (C<sub>2</sub>) encontrados nas unidades de acetil-coenzima A<sup>5</sup>, que por meio de várias reações de transferência forma o precursor isoprenóide ácido mevalônico. Em seguida, o ácido é convertido no composto difosfato de isopentenila (C<sub>5</sub>), concebendo, desta forma, a unidade isoprênica, uma das construções de preferência da natureza, encontrada em várias substâncias isoladas de produtos vegetais e animais como a borracha e o colesterol. Entretanto, alguns dos difosfatos de isopentenilas formados sofrem isomerizações para difosfato de dimetilalila (C<sub>5</sub>), onde, por sua vez, juntamente com o difosfato de isopentenila, se condensam iniciando a construção da cadeia isoprênica, fabricando primeiro por intermédio de enzimas transferase prenil, o composto difosfato de geranila (C<sub>10</sub>). Continuando as reações de condensação há a formação dos compostos com 15 e 20 unidades de carbono. Este último composto, o difosfato de geranylgeranila (C<sub>20</sub>), sofre dimerização, sintetizando assim o fitoeno, a estrutura básica acíclica dos carotenóides C<sub>40</sub>.

---

<sup>3</sup> "que se auto-alimentam".

<sup>4</sup> "que alimentam-se de outras células". As células dos animais superiores e da maioria dos microorganismos são heterotróficas.

<sup>5</sup> Acetil-coenzima A (CoA ou CaA-SH) - Enzima transportadora de grupos acetato, cuja molécula tem um grupo tiol (-SH) reativo. Nas reações de transferência, ligam-se ao grupo tiol os grupos a serem transportados.

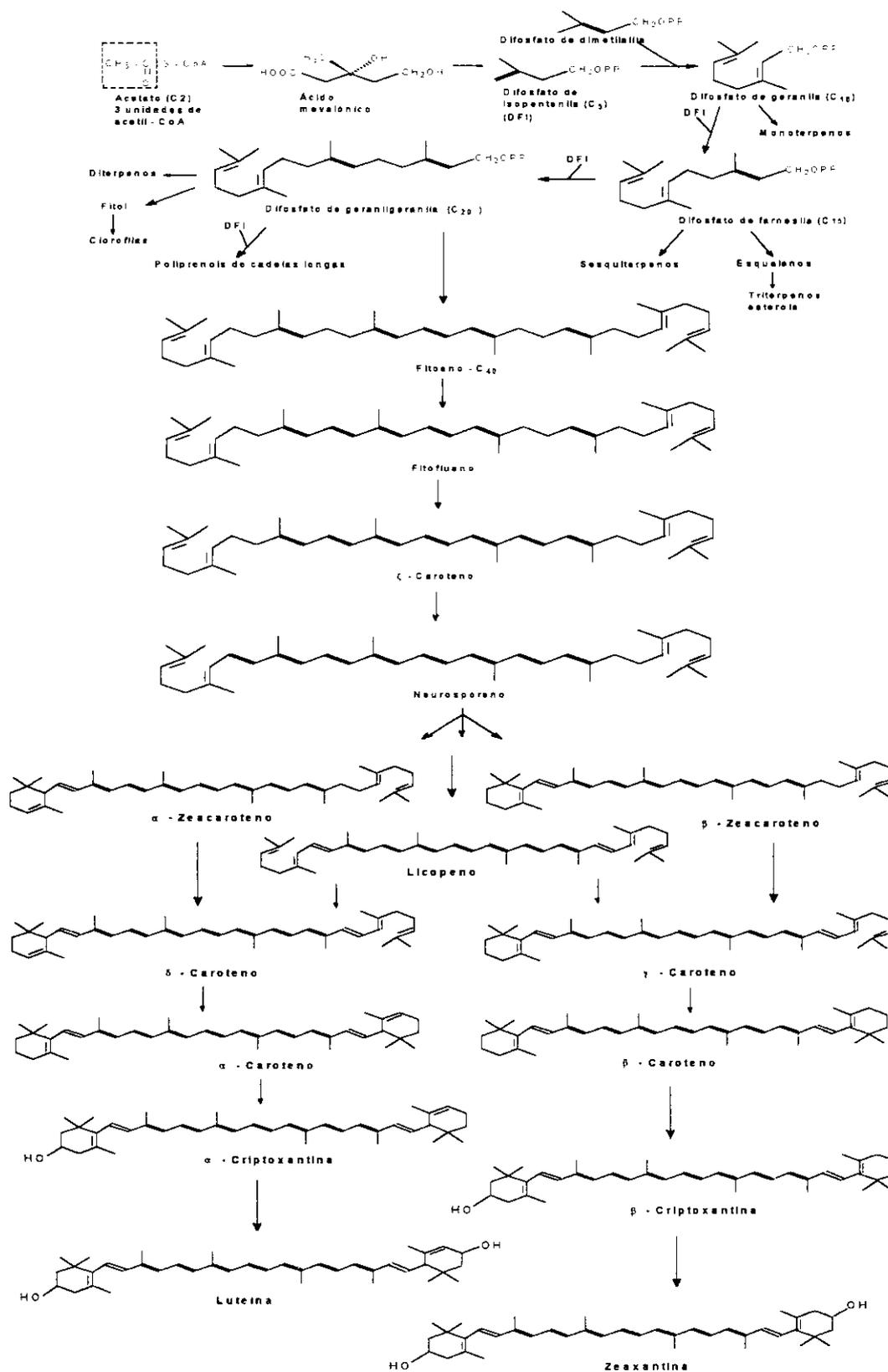


FIGURA 5 - Representação sumária da biossíntese dos carotenóides. Referências: BAUERNFEIND (1972); BRITTON (1988).

Nota: A estrutura molecular indicada acima para a α-criptoxantina está incorreta. É assumido atualmente que a α-criptoxantina possui um grupo hidroxila no átomo de carbono 3'. Na realidade, a estrutura acima pertence à zeinoxantina (BRITTON, 1991).

Logo depois, o fitoeno através de uma série de reações de desidrogenação torna-se precursor de outros carotenóides acíclicos, respectivamente, fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno e licopeno (BAUERNFEIND, 1972). Nesta fase, ocorre em seqüência, a perda de dois átomos de hidrogênio adjacentes (eliminação *trans*) formando uma nova dupla ligação e, à medida que os estágios avançam, aumenta o sistema cromóforo das moléculas (BRITTON, 1988). Todavia, os últimos passos da biossíntese dos carotenóides, a ciclização das estruturas e posteriores modificações estruturais, ainda não estão totalmente elucidados (OLSON, 1964; BAUERNFEIND, 1972). Alguns pesquisadores acreditam que o licopeno seja o precursor da ciclização das estruturas e da subsequente introdução dos grupos funcionais; outros acreditam na ciclização através da estrutura do neurosporeno, tendo como produtos iniciais os zeacarotenos (ARIMA, 1987). A evidência da ciclização pela via licopeno é mais consistente pois baseia-se em respostas de estudos em que o licopeno marcado transforma-se em carotenos cíclicos. Já a ciclização pela rota do neurosporeno se manifesta pela existência dos  $\alpha$ - e  $\beta$ -zeacarotenos (GOODWIN, 1971). Porém, de acordo com BRITTON (1988), esta questão não deve ter muita importância, uma vez que há fortes indícios que a ciclização pode ter ambos os caminhos, ocorrendo quando a metade da molécula carotenóide (ou seja, o grupo final) atinja o nível de desidrogenação correspondente ao licopeno. Com a ciclização dos carotenos formam-se os anéis  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\epsilon$ - provenientes de um mesmo precursor, cujo mecanismo de formação pode ser visto na Figura 6.

Após a ciclização dos carotenos, ocorre a hidroxilação nos carbonos 3 e/ou 3', gerando as xantofilas criptoxantinas, luteína e zeaxantina; a introdução é catalizada pela enzima oxidase e é realizada por substituição direta do átomo de hidrogênio do precursor carotenóide por uma hidroxila. É admitido que as outras modificações estruturais como a epoxidação, formação de carotenóides acetilênicos, alênicos e de apo-carotenóides são realizadas no final da seqüência biossintética (GOODWIN, 1971; BRITTON, 1988).

Na literatura, as etapas de isomerização e a de formação de epóxidos são consideradas etapas iniciais de degradação (GODOY, 1985). Pode-se concluir, então, que a partir dessas modificações mais complexas nas moléculas dos carotenóides, principalmente as realizadas por meio de reações oxidativas, as estruturas assim obtidas com estas características passam a ser consideradas como produtos de degradação.

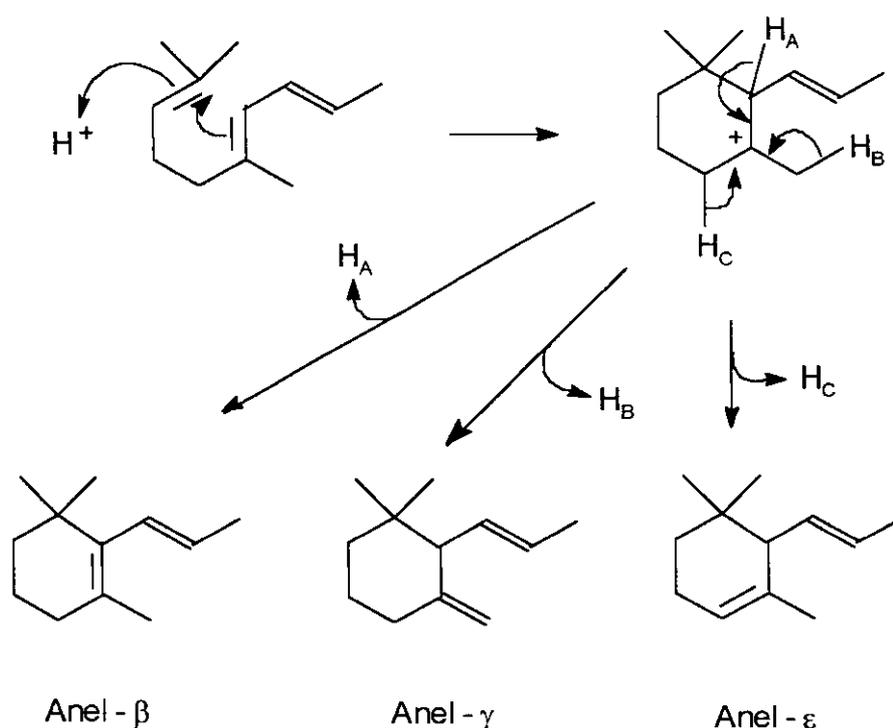


FIGURA 6 - Mecanismo de formação dos anéis  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$ .

Já as estruturas  $C_{30}$  (apo-carotenóides) são biossintetizadas por certas bactérias não fotossintéticas a partir de duas moléculas de difosfato de farnesila -  $C_{15}$  (Figura 5) (TAYLOR, 1983; BRITTON, 1988). Os carotenóides superiores ( $C_{45}$  e  $C_{50}$ ) são, da mesma forma, biossintetizados por bactérias não fotossintéticas do tipo gram-positivas; inicialmente formam esqueletos  $C_{40}$ , os quais são

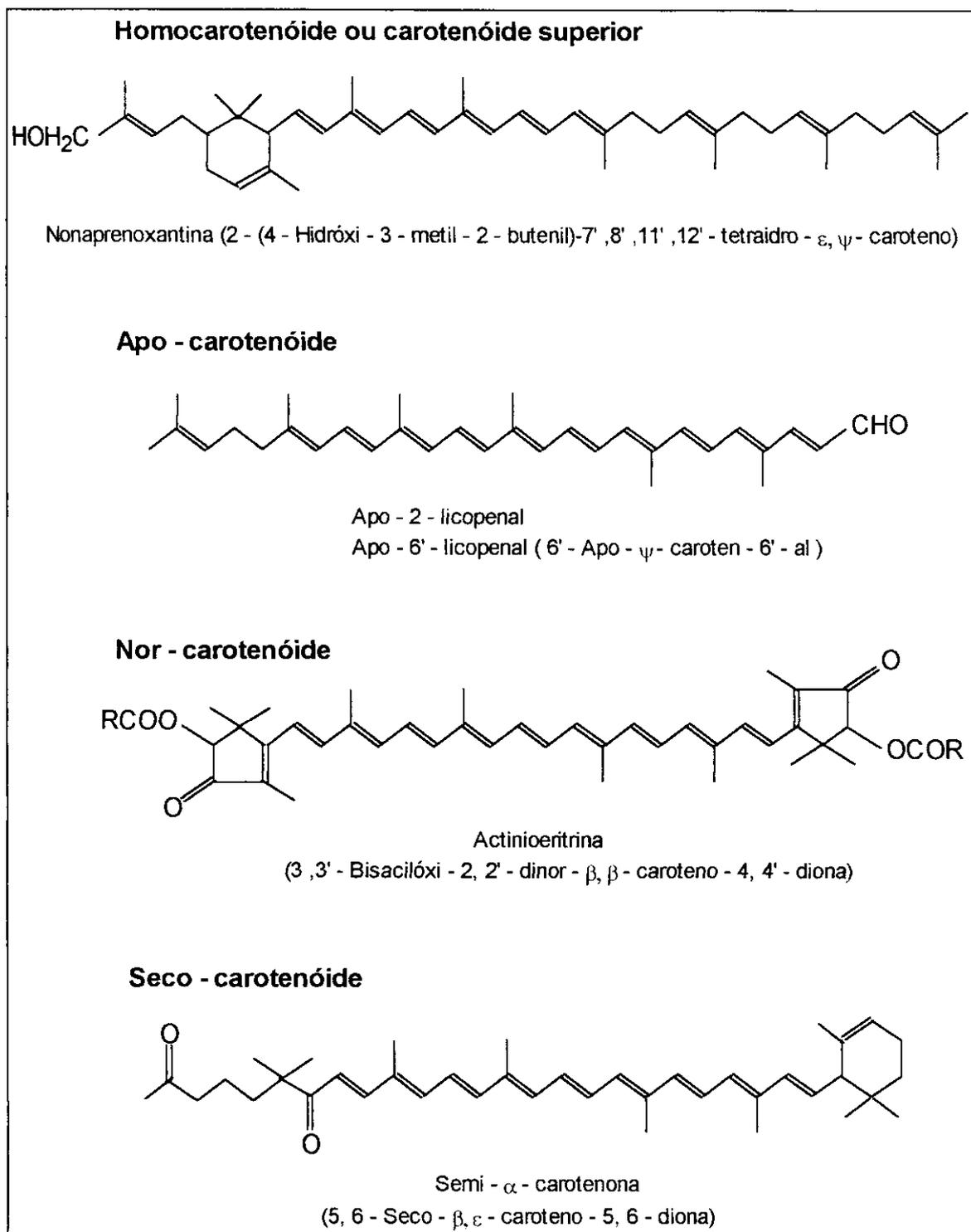
substituídos, em etapa posterior, geralmente no C<sub>2</sub>, por uma ou duas unidades isoprenóides (Figura 7). Acredita-se que muitos dos demais apo-carotenóides provenientes de plantas superiores são produtos de degradação dos normais C<sub>40</sub> (BRITTON, 1988), apesar de não haver evidências bioquímicas diretas que sustentem esta sugestão (BRITTON, 1992).

Informações mais detalhadas sobre a biossíntese dos carotenóides, incluindo os vários mecanismos de formação, podem ser encontradas nos artigos de GOODWIN (1971) e BRITTON (1988), bem como, nas citações destas referências.

## **2.4 Classificação dos carotenóides**

A classificação dos carotenóides pode ser feita de acordo com suas estruturas moleculares e pelos seus desempenhos nutricionais.

Baseado nos átomos presentes em suas estruturas podemos dividi-los em dois grandes grupos (Figura 8), onde o primeiro grupo é representado pelos hidrocarbonetos carotenóides, conhecidos como carotenos, possuindo em suas moléculas apenas átomos de carbono e hidrogênio. Já o segundo grupo de carotenóides, as xantofilas, possui além das estruturas moleculares características dos carotenos, átomos de oxigênio nas formas de grupos álcoois (monóis, dióis, polióis), cetonas, aldeídos, epóxidos, furanóxilas, metoxilas, ésteres, além de outros grupos funcionais, podendo ainda conter unidades glicosídicas e cadeias laterais de ácidos graxos acilados (BAUERNFEIND, 1972; TAYLOR, 1983). Porém alguns autores referem-se aos derivados oxigenados como oxicarotenóides, utilizando o termo xantofila somente para os hidroxicarotenóides (BAUERNFEIND, 1972; EMODI, 1978; KLÄUI e BAUERNFEIND, 1981; GORDON e BAUERNFEIND, 1982).



Referência: IUPAC - IUB (1975).

FIGURA 7 - Fórmulas estruturais de alguns carotenóides de ocorrência natural derivados de carotenóides C<sub>40</sub>.

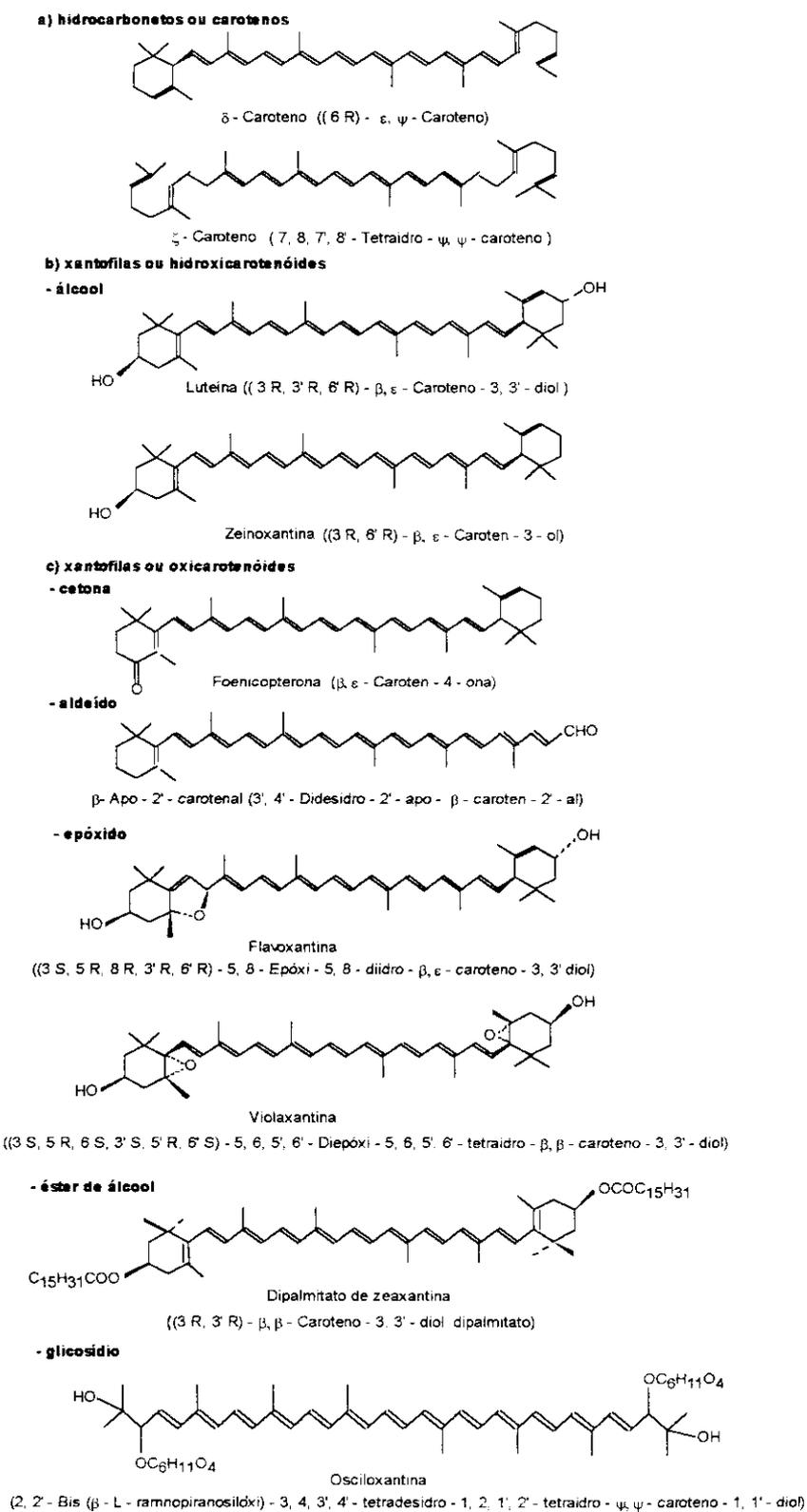


FIGURA 8 - Fórmulas estruturais de alguns carotenóides de ocorrência natural, classificados de acordo com os átomos presentes em suas moléculas.

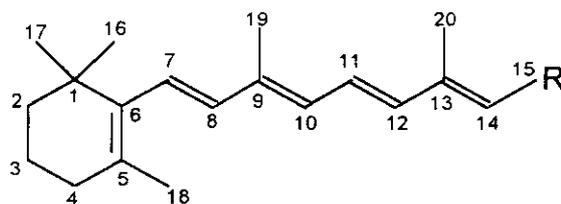
Há outras formas de classificar os carotenóides quanto a suas estruturas. Uma delas, segundo BAUERNFEIND (1972) seria identificá-los como acíclicos, monocíclicos e bicíclicos. Deste modo,  $\beta$ -caroteno (Figura 1), o carotenóide mais abundante e distribuído na natureza, é considerado um composto bicíclico (WEEDON, 1971).

Outra classificação é quanto ao número de átomos de carbono presentes nas moléculas. Grande parte dos carotenóides, principalmente os carotenos e as xantofilas encontrados nos alimentos, são tetraterpenos (40 átomos de carbono), denominados carotenóides  $C_{40}$  (Figuras 1, 4 e 8). Os triterpenos ( $C_{30}$ ) pertencem à classe do segundo maior grupo, os apo-carotenóides, sendo encontrados em certas bactérias não fotossintéticas (TAYLOR, 1983). Entretanto, modificações nas estruturas básicas dos  $C_{40}$  podem ocorrer, obtendo-se assim, os chamados carotenóides superiores (IUPAC-IUB, 1975), também denominados como homo- (TAYLOR, 1983), mono- ou carotenóides  $C_{40}$  dissubstituídos (IUPAC-IUB, 1975), os quais são formados pela adição de unidades isoprênicas nos terminos das estruturas  $C_{40}$ , originando compostos com mais de oito unidades ( $C_{45}$  a  $C_{50}$ ) ligadas de modo semelhante às substâncias de origem (Figura 7).

Pela remoção de frações dos finais da estrutura molecular dos  $C_{40}$ , obtém-se produtos de degradação com menos de 40 átomos de carbono, também caracterizados como apo-carotenóides. Esta denominação, apo-carotenóide, é dada para os compostos resultantes da remoção de fragmentos de uma das extremidades da molécula carotenóide e diapo-carotenóide para os compostos derivados da remoção de fragmentos de ambos os finais da molécula (BRITTON, 1993). Vale destacar que os compostos triterpênicos, mencionados anteriormente, não resultam dos  $C_{40}$ , pois são compostos biossintetizados a partir de duas moléculas de difosfato de farnesil ( $C_{15}$ ) (Figura 5) (TAYLOR, 1983). Além destas mudanças nas estruturas dos  $C_{40}$  ocorrem outras, como a eliminação de um ou

mais átomos de carbono (grupos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> ou CH) originando os nor-carotenóides, ou a fissão de uma das ligações carbono-carbono do grupo cíclico final da molécula (exceto a ligação entre os carbonos 1 e 6) com a adição do número apropriado de átomos de hidrogênio, gerando os seco-carotenóides (DAVIES, 1976). Pela mudança dos níveis de hidrogenação resultam os compostos "hidro" e "desidro". Os hidro-carotenóides são obtidos pela adição de átomos de hidrogênio em certos átomos de carbono (desfazendo duplas ligações), enquanto que com o processo inverso, obtém-se os desidro-carotenóides, ou seja, com a eliminação de átomos de hidrogênio há a formação de duplas ou triplas ligações na molécula. Já os *retro*-carotenóides são oriundos da migração, em uma posição, de todas as simples e duplas ligações do sistema poliênico conjugado constituinte de uma molécula carotenóide. Na Figura 7 estão demonstrados exemplos das estruturas moleculares referentes a algumas destas alterações.

A principal classificação dos carotenóides está relacionada com a atividade vitamínica A que exercem, representando a maior contribuição para a nutrição de seres humanos e de outros animais. O termo vitamina A refere-se a dois grupos distintos de substâncias consumidas nas dietas alimentares. O primeiro trata-se de várias formas de vitaminas A pré-formadas (retinóides) encontradas exclusivamente em alimentos de origem animal (fígado, carnes; leite, etc), onde incluem-se todos os compostos biologicamente ou estruturalmente relacionados com o retinol, ou seja, ácido retinóico, retinaldeídos e ésteres de retinila (Figura 9). O segundo grupo compreende os carotenóides provitamina A, que nos organismos animais, após a ingestão, são biologicamente transformados em vitamina A, isto é, em retinol. Desta forma, os carotenóides provitamina A podem ser considerados compostos precursores de retinol. As fontes deste segundo grupo de substâncias ativas são, em grande parte, os alimentos de origem vegetal, embora alguns alimentos de origem animal (gema de ovo, leite, manteiga, etc.) possam conter tanto a vitamina A como a provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).



Retinóides (Nomes triviais)	R
Retinol (vitamina A, vitamina A álcool, vitamina A <sub>1</sub> , vitamina A <sub>1</sub> álcool, axerofitol, axerol)	-CH <sub>2</sub> OH
3,4 - Didesidroretinol (vitamina A <sub>2</sub> , desidroretinol, 3 - desidroretinol)	-CH <sub>2</sub> OH (com uma dupla ligação a mais entre os carbonos 3 e 4)
4,5 - Didesidro - 5,6 - diidroretinol (α - vitamina A, reidrovitamina A)	-CH <sub>2</sub> OH (com a dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 - α-ionona)
3 - Hidroxiretinol	- CH <sub>2</sub> OH (com uma OH no carbono 3)
Isômeros do retinol - 13 - <i>cis</i> - retinol (neo - vitamina A), 11- <i>cis</i> (neo b), 9 - 13 - <i>cis</i> (iso b), 9 - <i>cis</i> (iso a) e 11 - 13 - <i>cis</i> (neo c)	-CH <sub>2</sub> OH
Retinal (retinaldeído, vitamina A <sub>1</sub> aldeído, retineno, retineno <sub>1</sub> )	-CHO
Ácido retinóico (vitamina A ácido, vitamina A <sub>1</sub> ácido, "tretinoin")	-COOH
13 - <i>cis</i> - Ácido retinóico ( "isotretinoin" )	-COOH
Acetato de retinila (acetato de retinol)	-CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub>
Palmitato de retinila (palmitato de retinol)	-CH <sub>2</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>

Referências: GOODWIN (1954); TAYLOR (1963); TEE (1992).

**Notas:**

Nomes triviais de alguns retinóides, cuja numeração da estrutura segue a numeração dos carotenóides. Na nomenclatura dos retinóides, o esquema de numeração difere do esquema de numeração dos carotenóides, onde o átomo de carbono ligado ao grupo funcional é dado como n<sup>o</sup> 1. Desta forma, o nome sistemático do retinol é: todo - *trans* - 3, 7 - dimetil - 9 - (2, 6, 6 - trimetilciclo - hex - 1 - en - 1 - il) - nona - 2, 4, 6, 8 - tetraen - 1 - ol.

A estrutura básica do hidrocarboneto que compõe os retinóides é denominada deoxiretino ou axerofiteno.

FIGURA 9 - Fórmulas estruturais da vitamina A em suas várias formas como retinóides.

A partir dessas considerações, os carotenóides podem ser classificados como carotenóides provitamina A e carotenóides inativos. BAUERNFEIND (1972) faz uma classificação mais detalhada, dividindo-os em: provitamina A ou precursores de vitamina A; precursores de vitamina A com função de pigmentar os tecidos animais; função de pigmentar tecidos animais sem atividade vitamínica e substâncias sem nenhuma das funções.

Com o decorrer das pesquisas, novos carotenóides são identificados e podem surgir novas substâncias com atividades vitamínica. Contudo, dentre os muitos carotenóides de ocorrência natural (mais de 500) uma pequena fração deles pode ser convertida em vitamina A. Segundo SWEENEY e MARSH (1970) apenas dez têm atividade vitamínica; OLSON e LAKSHMANAN (1970) citam dezenove compostos ativos; BAUERNFEIND (1972) apresenta trinta e dois carotenóides com atividade vitamínica, não levando em consideração, neste número, os provavelmente ativos, e OLSON (1989), em um trabalho posterior, já menciona aproximadamente cinquenta carotenóides com atividade vitamínica. Até o momento, destes cinquenta compostos ativos, menos da metade (cerca de vinte) têm sua atividade biológica determinada.

De uma forma geral, as classificações dos carotenóides estão baseadas nas suas estruturas químicas. Assim, resumidamente, a Tabela 1 apresenta, nos vários modos, as classificações de alguns carotenóides de ocorrência natural citados neste trabalho.

TABELA 1 - Classificações de alguns carotenóides.

Carotenóides		Classificação		
	Quanto ao número de anéis na estrutura	Quanto aos átomos presentes na molécula	Quanto ao número de átomos de carbono na molécula	Quanto à atividade vitamínica
licopeno	acíclico	hidrocarboneto ou caroteno	tetraterpeno	inativo
$\beta$ -caroteno	bicíclico	hidrocarboneto ou caroteno	tetraterpeno	ativo
$\alpha$ -caroteno	bicíclico	hidrocarboneto ou caroteno	tetraterpeno	ativo
zeaxantina	bicíclico	xantofila ou hidroxicarotenóide	tetraterpeno	inativo
luteína	bicíclico	xantofila ou hidroxicarotenóide	tetraterpeno	inativo
$\beta$ -apo-8'-carotenal	monocíclico (derivado de um bicíclico)	xantofila ou oxicarotenóide	triterpeno (apo-carotenóide)	ativo
$\beta$ -criptoxantina	bicíclico	xantofila ou hidroxicarotenóide	tetraterpeno	ativo
$\alpha$ -criptoxantina	bicíclico	xantofila ou hidroxicarotenóide	tetraterpeno	ativo
cantaxantina	bicíclico	xantofila ou oxicarotenóide	tetraterpeno	inativo

## 2.5 Atividade biológica

Considera-se que carotenóides são precursores de vitamina A se suas estruturas forem compostas de um anel  $\beta$ -ionona não substituído fixado a uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos, correspondendo assim à uma molécula de vitamina A, na forma de retinol<sup>6</sup> (Figura 9). Desse modo, precisa-se ter a metade da molécula do *trans*- $\beta$ -caroteno, que apresenta uma estrutura formada por dois anéis  $\beta$ -ionona unidos por uma cadeia poliênica de 22 carbonos (Figura 1). De acordo com esta regra, os carotenóides acíclicos como o licopeno e o  $\zeta$ -caroteno são inativos. Também não possuem atividade vitamínica os compostos  $\alpha$ -zeacaroteno e  $\delta$ -caroteno, por terem parte de suas estruturas na forma acíclica e parte composta por um anel  $\alpha$ -ionona (dupla ligação entre os carbonos 4 e 5) e, compostos como a luteína, zeaxantina, zeinoxantina e violaxantina por apresentarem substituições nos anéis  $\beta$ -ionona. São precursores de vitamina A os carotenóides  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina e outros (Figura 5).

Entretanto, existem exceções a esta norma geral (anel  $\beta$ -ionona não substituído). Segundo BAUERNFEIND (1972), vários trabalhos indicam a introdução de substituintes em certas posições do anel  $\beta$ -ionona, sem contudo, prejudicar sua atividade biológica. É o caso do composto 5,6:5',6'-diepóxido- $\beta$ -caroteno (Tabela 2), o qual, presume-se que seja convertido "in vivo" em  $\beta$ -caroteno, uma vez que não aparece no sangue e, portanto, é considerado ativo (GOODWIN, 1954). Os compostos 5,6-monoepóxido- $\beta$ -caroteno e 5,8-monofuranóxido- $\beta$ -caroteno são precursores de vitamina A, pois seguem a norma do anel  $\beta$ -ionona não substituído, apesar de exibirem oxidação em um dos anéis da estrutura. Porém, na literatura há uma divergência sobre o composto 5,8:5',8'-difuranóxido- $\beta$ -caroteno (aurocromo); GOODWIN (1954) cita-o como inativo e

<sup>6</sup> Nome sistemático: todo-*trans*-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclo-hex-1-en-1-il)-nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol.

BAUERNFEIND (1972) menciona-o como ativo. Este último autor comenta também que os epóxidos anteriormente citados (5,6; 5,8 e 5,8:5',8') parecem se converter em  $\beta$ -caroteno do mesmo modo que o 5,6:5',6'-diepóxido.

Outras modificações como as adições de grupos metilas nas posições 2,2' do  $\beta$ -caroteno ou a substituição da metila por um grupo etila nas posições 1 ou 1,1', não destroem a atividade vitamínica. Compostos como 3,4 desidro- $\beta$ -caroteno e 3,4,3',4'-bisdesidro- $\beta$ -caroteno permanecem ativos, apesar de sofrerem desidrogenação nos anéis  $\beta$ -ionona, (surgindo assim, uma dupla ligação a mais entre os carbonos 3 e 4 ou 3' e 4'). Esta modificação da estrutura provoca uma diminuição na biopotência vitamínica. Por outro lado, mudanças como a substituição de uma metila por grupo isobutila na posição 1,1', hidrogenação em ambos os anéis  $\beta$ -ionona ou nas duplas ligações da cadeia lateral, remoção do grupo metila no carbono 13, encurtamento da cadeia lateral, introdução de oxigênio nas formas hidroxilas e cetonas em ambos anéis (nas posições 3 e 3', 4 e 4') e oxidação com abertura dos anéis ou remoção dos anéis  $\beta$ -ionona (tornando a molécula acíclica), destroem completamente a atividade biológica (PITT, 1971; BAUERNFEIND, 1972).

Portanto, as diferenças entre as estruturas dos carotenóides provitamínicos (grupos substituintes, estado de oxidação, grau de insaturação) conferem aos mesmos diferentes capacidades de conversão a vitamina A (retinol). Outros fatores também afetam esta capacidade, como a absorção e conversão pelos organismos. A Tabela 2 apresenta as atividades vitamínicas A de alguns carotenóides, determinadas até o momento. Esses valores, compilados de várias referências por BAUERNFEIND (1972), estão relacionados com o  $\beta$ -caroteno, considerado com 100% de atividade.

TABELA 2 - Atividade vitamínica A de alguns carotenóides.

Carotenóides	Atividade vitamínica A (%)
$\beta$ -Caroteno	100
$\alpha$ -Caroteno	50 - 54
$\gamma$ -Caroteno	42 - 50
$\beta$ -Criptoxantina (3-Hidroxi- $\beta$ -caroteno)	50 - 60
Isocriptoxantina (4-Hidroxi- $\beta$ -caroteno)	48
$\alpha$ -Criptoxantina <sup>1</sup>	ativa (nd) <sup>2</sup>
$\beta$ -Apo-8'-carotenal	72
$\beta$ -Apo-2'-carotenal	ativo
$\beta$ -Zeaxaroteno	20 - 40
3,4-Desidro- $\beta$ -caroteno (3-Desidro- $\beta$ -caroteno)	75
3,4,3',4'-Bisdesidro- $\beta$ -caroteno (3,4,3',4'-tetradesidro- $\beta$ -caroteno)	38
2,2'-Dimetil- $\beta$ -caroteno	50
1,1'-Bisdimetil-1,1'-bisetil- $\beta$ -caroteno	41
$\beta$ -Caroteno-5,6-monoepóxido	21
$\beta$ -Caroteno-5,6:5',6'-diepóxido	ativo
$\beta$ -Caroteno-5,8-furanóxido (Mutatocromo)	50
$\beta$ -Caroteno-5,8:5',8'-difuranóxido (Aurocromo) <sup>3</sup>	ativo

Referência: BAUERNFEIND (1972).

<sup>1</sup> Admite-se a atividade biológica da  $\alpha$ -criptoxantina, baseando-se na sua estrutura molecular.

<sup>2</sup> nd - atividade biológica não determinada (RODRIGUES-AMAYA, 1989).

<sup>3</sup> BAUERNFEIND (1972) cita-o como ativo; GOODWIN (1954) menciona-o como inativo.

Rearranjos nas estruturas *trans*, através de reações de isomerização catalizadas principalmente pelo calor, luz ou ácido, também alteram a absorção biológica da vitamina A. Com a formação de isômeros geométricos *cis*, ocorre uma diminuição na biodisponibilidade das provitaminas. Trabalhos relatam este decréscimo utilizando diferentes metodologias para a medida da atividade vitamínica. DEUEL *et al.* (1944, 1945 a e b) investigaram o ganho de peso em ratos, tratados com isômeros isolados; JOHNSON e BAUMANN (1947) e SWEENEY e MARSH (1973) verificaram a conversão dos isômeros pelo armazenamento da vitamina A no fígado de ratos. Dados diferenciados da bioatividade dos vários isômeros *cis*, encontrados por estes autores e por ZECHMEISTER (1962), são apresentados na Tabela 3.

## 2.6 Nomenclatura dos carotenóides

Antes de 1931, acreditava-se que o primeiro composto descoberto, "caroteno", isolado de cenoura (*Daucus carota* L.), constituía-se de uma única substância. Verificando os dados obtidos até a presente data, pesquisadores notaram que "carotenos" isolados de diferentes vegetais (couve, cenoura, espinafre e outros) apresentavam variações em seus pontos de fusão e divergências em suas atividades ópticas (compostos inativos passavam a ser opticamente ativos após várias cristalizações). Através dos desenvolvimentos dos trabalhos, por meio da cromatografia de adsorção ou pela precipitação fracional, puderam separar dois isômeros de soluções preparadas de "caroteno" que apresentavam atividade óptica. Utilizando-se do alfabeto grego e mantendo o nome originário "caroteno" denominaram  $\alpha$ -caroteno para a primeira substância fortemente dextro-rotatória ( $[\alpha]_D^{20} = 34,0^\circ$  em benzeno) e a segunda, opticamente inativa, como  $\beta$ -caroteno. Logo em seguida (1932), um terceiro isômero,  $\gamma$ -caroteno, foi descoberto (DEUEL, 1951).

TABELA 3 - Bioatividade relativa dos isômeros geométricos de carotenóides provitamínicos A em ratos, determinada por alguns autores.

Isômeros geométricos	Bioatividade (%)			
	DEUEL <i>et al.</i> (1945b)	JOHSON & BAUMANN (1947)	ZECHMEISTER (1962) <sup>1</sup>	SWEENEY & MARSH (1973)
13- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno (neo- $\alpha$ -caroteno B)	16		16	22
<i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno	53	25	53	37
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno (neo- $\alpha$ -caroteno U)	13		13	23
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (neo- $\beta$ -caroteno B)	53	48	53	74
<i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	100	100	100	100
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (neo- $\beta$ -caroteno U)	38	33	38	61
15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno <sup>2</sup> (central-momocis)			30 - 50 <sup>3</sup>	
<i>trans</i> - $\gamma$ -caroteno <sup>4</sup>	28		43	
neo- $\gamma$ -caroteno P			19	
pro- $\gamma$ -caroteno <sup>5</sup>	44		43	
$\beta$ -criptoxantina ( <i>trans</i> -criptoxantina; criptoxantina)			57	
neo-criptoxantina U			27	
neo-criptoxantina A			42	

<sup>1</sup> No artigo de ZECHMEISTER (1962) estão citados vários valores já descritos por DEUEL (1945b).

<sup>2</sup> Obtido por síntese.

<sup>3</sup> Em baixas doses.

<sup>4</sup> Obtido de pro- $\gamma$ -caroteno.

<sup>5</sup> Pro - termo usado por ZECHMEISTER para definir um carotenóide de ocorrência natural com configuração *cis*. Para as formas *total-trans* de ocorrência natural não são dadas nenhuma especial designação (GOODWIN, 1954).

Com o surgimento de novos carotenóides, nomes triviais foram adotados e derivados geralmente do nome do material biológico utilizado no isolamento do pigmento, tornando a nomenclatura um tanto complicada. Baseando-se nos princípios da química orgânica, normas definitivas para a nomenclatura dos carotenóides foram aprovadas nas 14<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> Conferências da IUPAC<sup>7</sup>, respectivamente em 1947 e 1951 (IUPAC - IUB, 1972; IUPAC - IUB, 1975).

Entretanto, devido à descoberta de um grande número de novas estruturas de carotenóides naturais, estas normas até então em vigência não abrangiam adequadamente todas as situações. Assim, no período de 1965 a 1974, a Comissão sobre a Nomenclatura de Química Orgânica - IUPAC, em conjunto com a Comissão sobre Nomenclatura Bioquímica - IUPAC-IUB<sup>8</sup> reuniram e revisaram tais normas, aprovando-as em 1974. As normas revisadas para a nomenclatura dos carotenóides passaram a ser conhecidas como "Recomendações IUPAC - IUB 1974". Foram traçadas a fim de definir as estruturas dos carotenóides através de seus nomes semi-sistemáticos e para assegurar uma melhor comunicação entre os pesquisadores.

Todavia, tem sido recomendado por estas Comissões que, se forem usados os nomes triviais nos trabalhos científicos, estes devem ser sempre acompanhados dos nomes semi-sistemáticos em uma primeira menção, na forma de notas de rodapé ou entre parênteses. Sugerem ainda que os nomes triviais devem ser limitados em trabalhos orgânicos, apesar de não serem impedidos em relatos bioquímicos, biológicos e de produtos naturais.

A nomenclatura dos carotenóides, recomendada pela IUPAC - IUB 1974, é discutida a seguir. Informações mais detalhadas poderão ser obtidas junto a sua publicação (IUPAC - IUB, 1975).

---

<sup>7</sup> IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry.

<sup>8</sup> IUB - International Union of Biochemistry.

1) Estruturas - no novo sistema todos os carotenóides podem ser derivados da estrutura acíclica  $C_{40}H_{56}$  cuja estrutura e numeração são apresentadas na Figura 10, que corresponde à fórmula estrutural do licopeno, primeiramente postulada em 1910 por WILLSTÄTTER e MIEG (DEUEL, 1951).

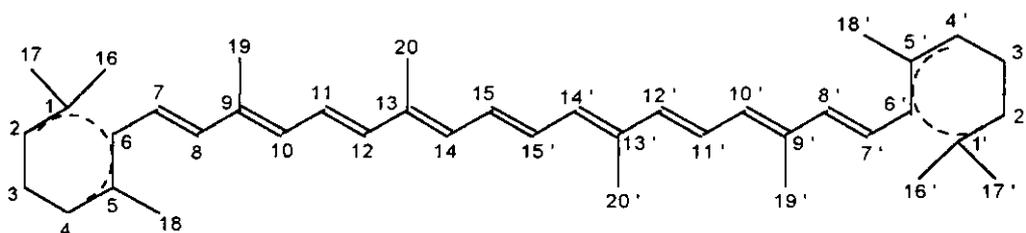


FIGURA 10 - Estrutura acíclica  $C_{40}H_{56}$ .

2) Formações das estruturas - podem ser realizadas através de reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação da estrutura  $C_{40}H_{56}$  ou pela combinação de alguns destes processos.

3) Nomes específicos ou semi-sistemáticos dos carotenóides - são formados pelo nome originário "caroteno" prefixados de duas letras gregas, as quais indicam os dois grupos finais da molécula. São colocadas sempre na ordem alfabética (isto é,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\phi$ ,  $\chi$ ,  $\psi$ ) onde a primeira é separada da segunda por uma vírgula, e a segunda é unida por um hífen ao nome originário. A Figura 11 apresenta as designações dos grupos finais, bem como, a numeração dos carbonos destes grupos e os da cadeia poliênica que compõem uma molécula carotenóide. Exemplificando, pela combinação de dois grupos finais com duas cadeia poliênicas R pode-se formar as estruturas do  $\beta$ -caroteno ( $\beta,\beta$ -caroteno) (Figura 1);  $\alpha$ -caroteno ( $\beta,\epsilon$ -caroteno) (Figura 4) e do licopeno ( $\psi,\psi$ -caroteno) (Figuras 1 e 4).

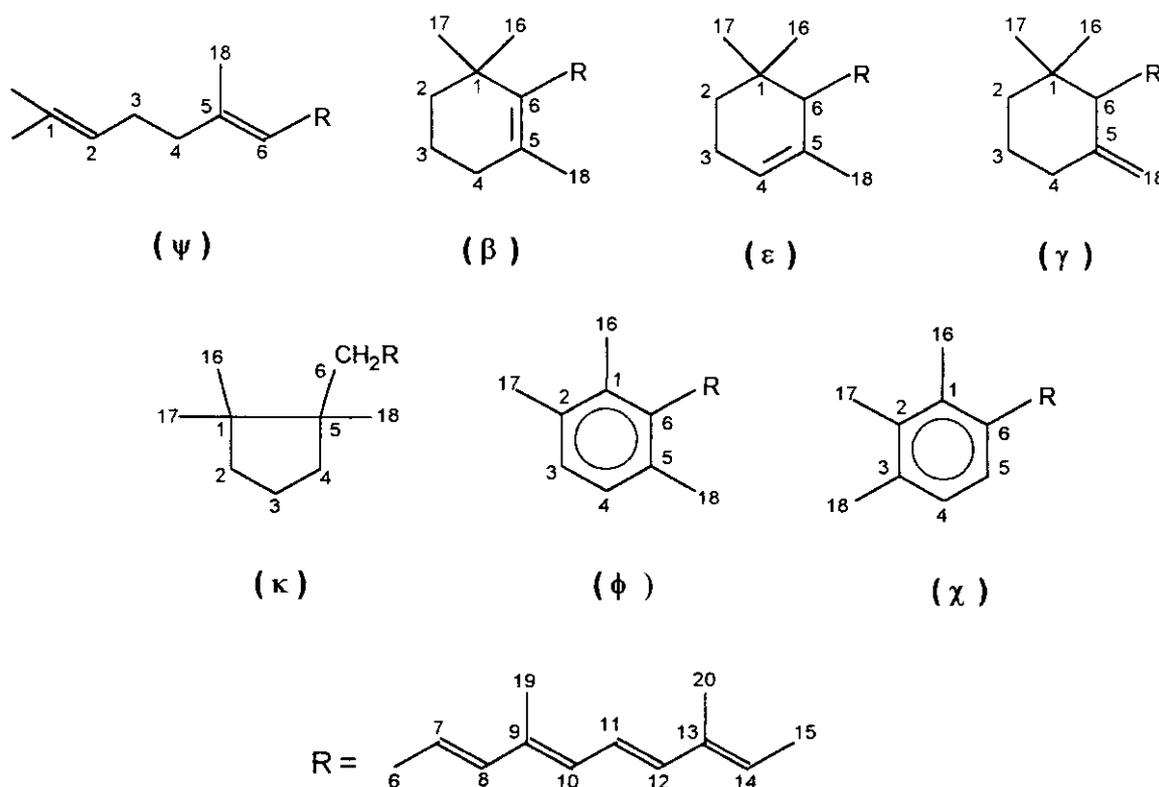
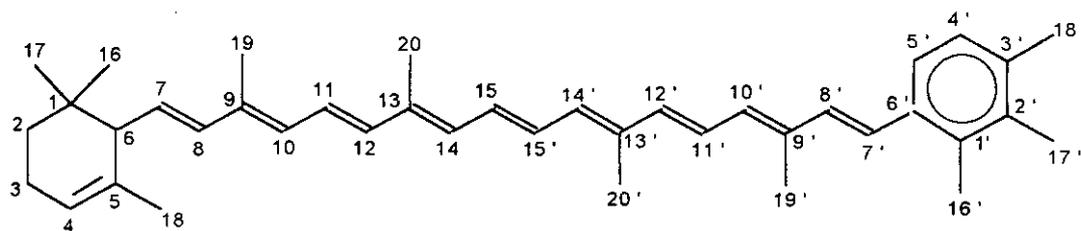


FIGURA 11 - Designação e numeração dos grupos finais.

4) Desenho das fórmulas estruturais e numeração dos hidrocarbonetos carotenóides - os números não plicados<sup>9</sup> são dados para os grupos finais correspondentes ao primeiro prefixo (letra grega) que compõe o nome do carotenóide. Recomenda-se desenhar as fórmulas estruturais dos carotenóides colocando sempre os números não plicados à esquerda e os plicados à direita. Inicia-se a numeração pelos átomos de carbonos pertencentes aos grupos finais estendendo até a metade da cadeia poliênica (Figura 12).

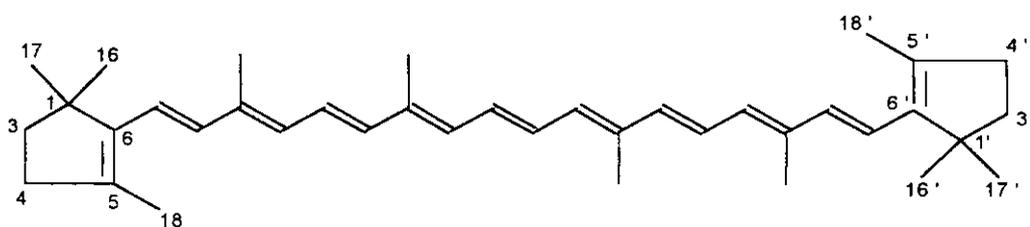
5) Indicação das localizações de alterações no nome do carotenóide - todas as localizações não plicadas (que indicam modificações nos átomos de carbono) são mencionadas antes das localizações plicadas (Figuras 13 e 14).

<sup>9</sup> plica - sinal gráfico que se coloca ao alto e à direita de uma letra ou número. Ex.: 2' (lê-se dois linha).

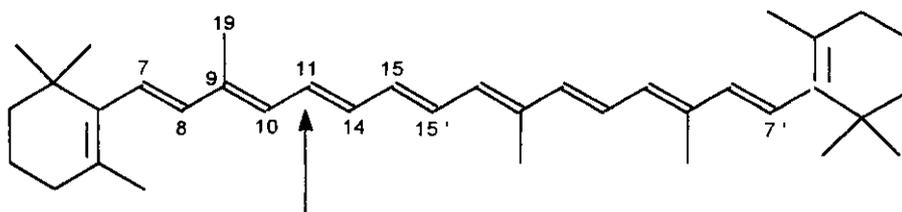


$\epsilon, \chi$  - Caroteno

FIGURA 12 - Desenho da estrutura e numeração de um carotenóide.



2, 2' - Dinor -  $\beta, \beta$  - caroteno



12, 13, 20 - Trinor -  $\beta, \beta$  - caroteno

FIGURA 13 - Fórmulas estruturais de nor-carotenóides.

6) Alterações nos grupos finais da molécula - quando um carotenóide sofre alterações nos grupos finais da molécula, podendo ter mais que um grupo final de origem, recebe a designação correspondente ao grupo final que primeiro integrar a ordem alfabética grega (Figura 15).

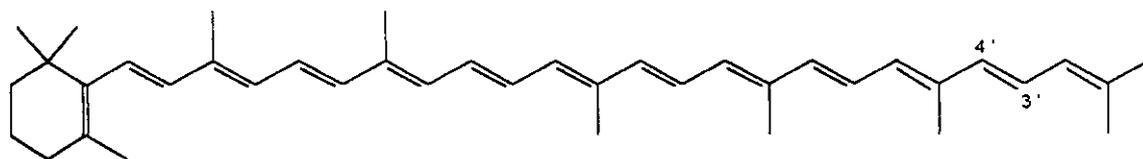
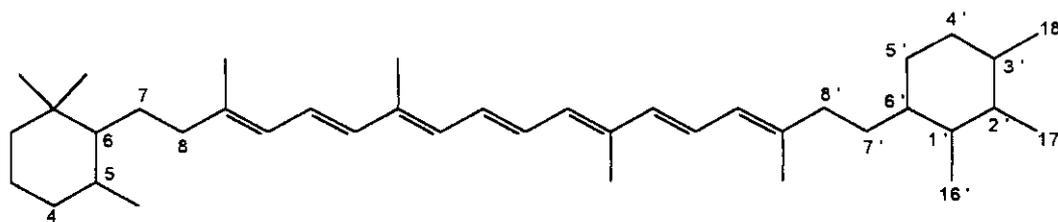
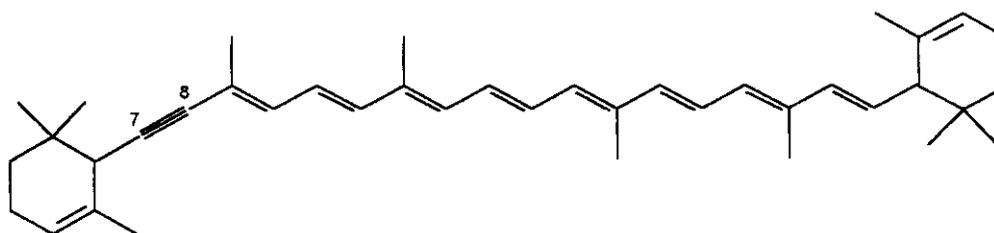
3', 4' - Didesidro -  $\beta$ ,  $\psi$  - caroteno5, 6, 7, 8, 1', 2', 3', 4', 5', 6', 7', 8' - Dodecaidro -  $\beta$ ,  $\chi$  - caroteno7, 8 - Didesidro -  $\epsilon$ ,  $\epsilon$  - caroteno

FIGURA 14 - Carotenóides com mudanças dos níveis de hidrogenação.

7) Nor-carotenóides - para os carotenóides que sofreram eliminações de átomos de carbono, chamados nor-carotenóides, é usado o prefixo "nor" precedido da numeração dos locais em que ocorreram as eliminações, permanecendo a designação do grupo final e a numeração básica do carotenóide de origem (Figuras 7 e 13).

8) Seco-carotenóides - a nomenclatura indica para os seco-carotenóides o prefixo "seco" precedido da numeração onde houve a fissão da ligação, permanecendo a designação do grupo final e a numeração do carotenóide de origem (Figuras 7 e 16).



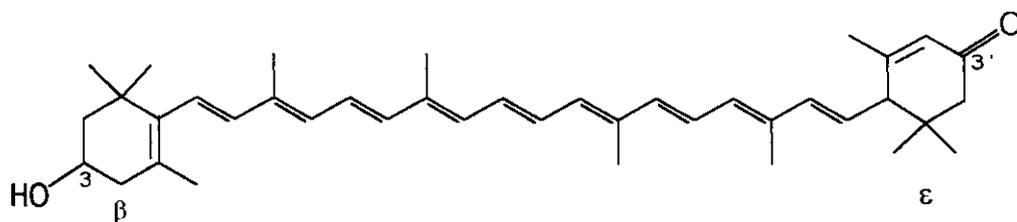
## 10) Carotenóides oxigenados

a) a nomenclatura dos carotenóides oxigenados derivados dos hidrocarbonetos carotenóides é executada classificando os grupos encontrados na molécula carotenóide na seguinte ordem: ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, aldeído, cetona, álcool e éster de álcool carotenóide. É usado como "sufixo" o termo proposto pelas normas gerais da química orgânica, referente ao primeiro grupo oxigenado pertencente a esta classificação, sendo os demais grupos oxigenados (se existentes), mencionados como "prefixos" (prefixos estes, respectivos aos grupos oxigenados e usuais das normas gerais da química orgânica) (Figura 17).

b) os grupos oxigenados na função éter (sem formação de pontes) são nomeados de acordo com os prefixos "alcóxi" ou "arilóxi" (Figura 18).

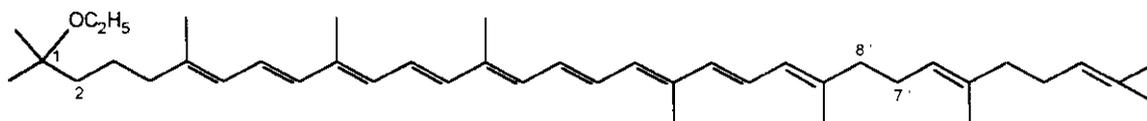
c) derivados oxigenados com formação de pontes de oxigênio são intituladas pelo prefixo "epóxi", precedido pela localizações das reações (numeração dos átomos de carbono onde ocorreram as reações). Cabe ressaltar que observando um epóxido carotenóide deduz-se que o composto é formado pela adição de um átomo de oxigênio a uma dupla ligação. Sabe-se entretanto que o epóxido carotenóide é formado pela adição inicial de átomos de hidrogênio em cada um dos átomos de carbono participantes da ponte, seguido da substituição destes átomos de hidrogênio por um átomo de oxigênio (formando a ponte) e, conseqüentemente derivando um composto "epóxidiidro" (Figura 19).

d) derivados de hidrocarbonetos carotenóides com a adição a uma dupla ligação de elementos de água (H, OH) ou de metanol (H, OCH<sub>3</sub>) são denominados "hidróxidiidro" ou "metóxidiidro" (Figura 20).



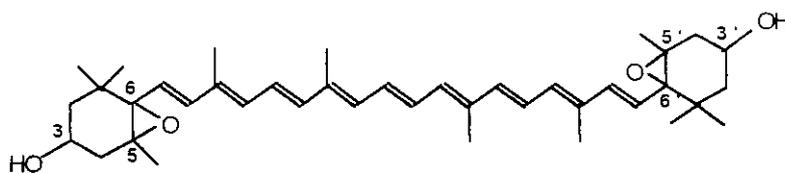
3 - Hidróxi -  $\beta$ ,  $\epsilon$  - caroten - 3' - ona

FIGURA 17 - Carotenóide oxigenado derivado de hidrocarboneto carotenóide.

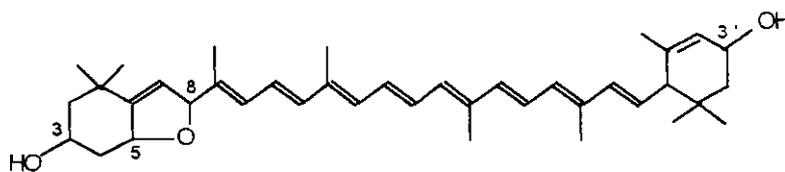


1 - Etóxi - 1, 2, 7', 8' - tetraidro -  $\psi$ ,  $\psi'$  - caroteno

FIGURA 18 - Denominação de um carotenóide oxigenado com função éter.

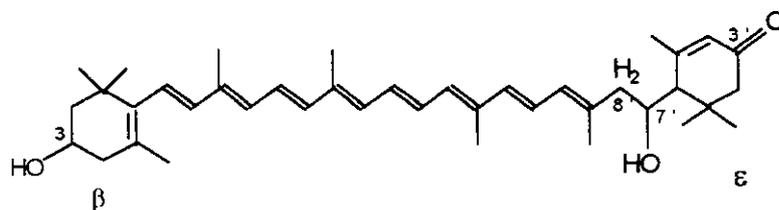


5,6 : 5',6' - Diepóxi - 5,6,5',6' - tetraidro -  $\beta, \beta$  - caroteno - 3,3' - diol

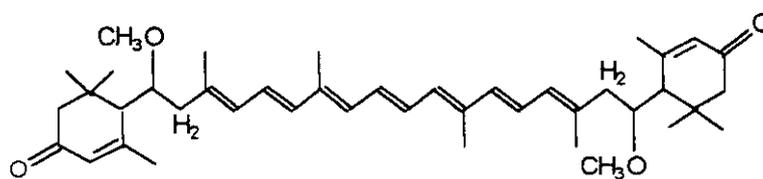


5,8 - Epóxi - 5,8 - diidro -  $\beta, \epsilon$  - caroteno - 3,3' - diol

FIGURA 19 - Derivados oxigenados com função éter (epóxidos).



3,7' - Dihidróxi - 7',8' - diidro -  $\beta, \epsilon$  - caroten - 3' - ona

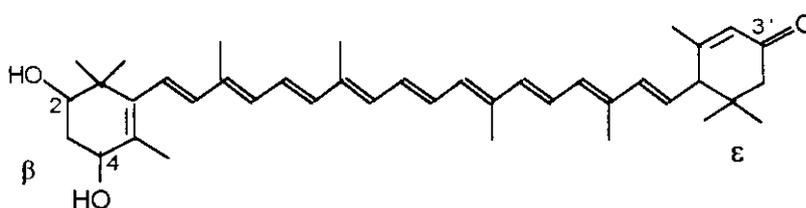


7,7' - Dimetóxi - 7,8,7',8' - tetraidro -  $\epsilon, \epsilon$  - caroteno - 3,3' - diona

FIGURA 20 - Compostos derivados de hidrocarbonetos carotenóides com adição de elementos de água e metanol.

## 11) Numeração dos carotenóides oxigenados

a) a numeração dos carotenóides oxigenados é feita de modo semelhante à numeração dos hidrocarbonetos carotenóides, ou seja, se os grupos finais diferirem entre si, os números não plicados são destinados para o grupo final representado pela letra grega que primeiro integrar o alfabeto grego e que primeiro compõe o nome do carotenóide (Figura 21).



2, 4 - Diidróxi -  $\beta$ ,  $\epsilon$  - caroten - 3' - ona

FIGURA 21 - Numeração de um carotenóide oxigenado com grupos finais desiguais.

b) quando grupos finais são idênticos, a numeração é realizada tomando a menor localização possível para o grupo oxigenado considerado principal a ser usado como "sufixo" (Figura 22).

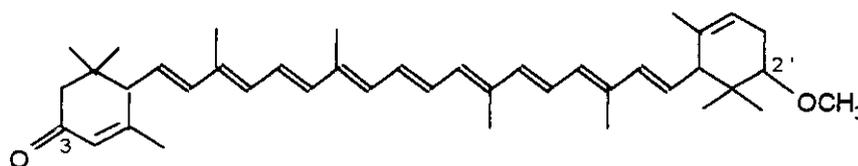


FIGURA 22 - 2' - Metóxi -  $\epsilon$ ,  $\epsilon$  - caroten - 3 - ona.

O composto referenciado nesta figura recebe a menor numeração e o nome de 2'-Metóxi- $\epsilon$ , $\epsilon$ -caroten-3-ona e não 2-Metóxi- $\epsilon$ , $\epsilon$ -caroten-3'-ona, uma vez que pelas regras da nomenclatura dos carotenóides, números não plicados são citados antes dos números plicados e estes são considerados maiores que os números não plicados, ou seja, 3' > 3.

c) quando existirem dois grupos oxigenados idênticos na molécula e que poderão ser tomados como “sufixo”, a numeração é executada levando em consideração a menor localização de um dos grupos a ser considerado como “sufixo” (Figura 23).

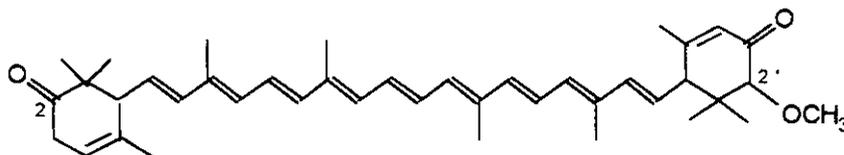


FIGURA 23 - 2' - Metóxi - ε, ε - caroteno - 2, 3' - diona e não 2 - Metóxi - ε, ε - caroteno - 3, 2' - diona ( 2, 3' < 3, 2' ).

d) Se não existir na molécula grupos oxigenados com características de serem usados como “sufixos”, a numeração é definida com a menor localização possível de todos os grupos mencionados como “prefixos” (Figura 24).

12) Mudanças nas posições das ligações de um sistema poliênico conjugado - é indicado o prefixo *retro* (escrito em itálico) para a migração, em uma posição, das simples e duplas ligações de um sistema poliênico conjugado de uma molécula carotenóide, precedido pela numeração dos locais onde aconteceram tais mudanças (Figura 25), de acordo com:

a) o primeiro local é aquele correspondente ao átomo de carbono que tenha perdido um próton e o segundo local correspondente ao átomo de carbono que tenha ganho um próton;

b) o prefixo *retro* e a numeração do par de locais são colocados hifenizados antes das letras gregas.

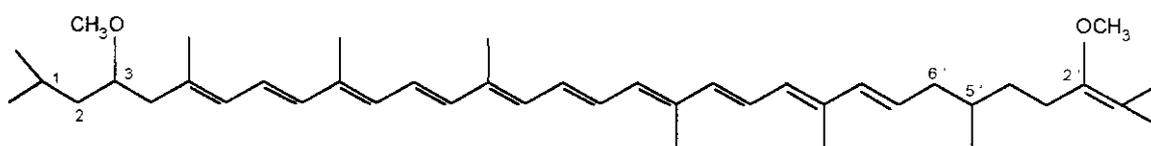
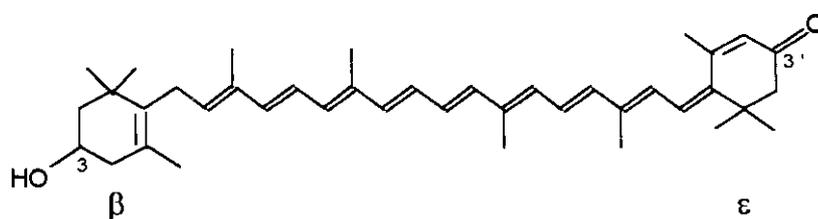
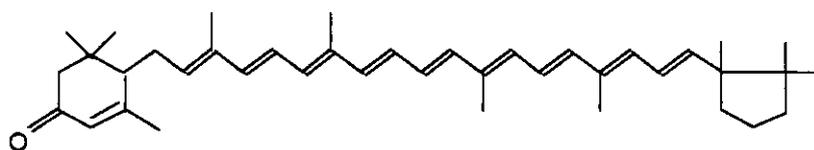


FIGURA 24 - 3, 2'- Dimetóxi - 1, 2, 5', 6' - tetraidro -  $\psi$ ,  $\psi$  - caroteno e não 2, 3' - Dimetóxi - 1', 2', 5, 6 - tetraidro -  $\psi$ ,  $\psi$  - caroteno (a série 1, 2, 3, 2', 5', 6' é menor que a série 2, 5, 6, 1', 2', 3').



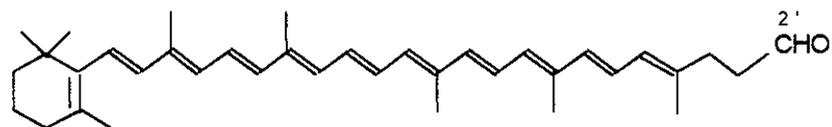
(a)



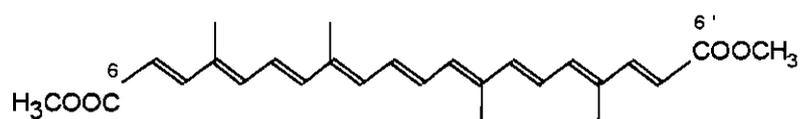
(b)

FIGURA 25 - a) 3- Hidróxi- 6', 7 - *retro* -  $\beta$ ,  $\epsilon$  - caroten - 3' -ona; b) 6', 7 - *retro* -  $\epsilon$ ,  $\kappa$  - Caroten - 3 -ona.

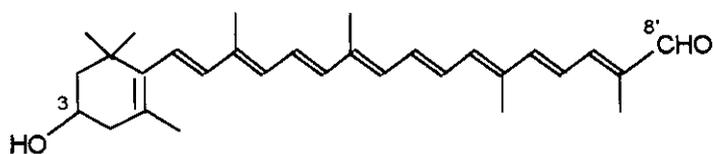
13) Apo-carotenóides - a remoção de fragmentos de um dos finais da molécula de um carotenóide recebe o prefixo "apo", enquanto que a remoção de fragmentos de ambos os finais da molécula recebe o prefixo "diapo" (Figura 26), com as seguintes considerações:



(a)



(b)



(c)

FIGURA 26 - a) 2' - Apo -  $\beta$ ,  $\psi$  - caroten - 2' - al; b) Dimetil - 6, 6' - diapocaroteno - 6, 6' - dioato (*trans* - Metilbixina); c) 3 - Hidróxi - 8' - apo -  $\beta$  - caroten - 8' - al.

a) o prefixo "apo" é precedido pela numeração do local de remoção e estes são precedidos da designação do grupo final (letra grega).

b) se a remoção acontecer no carbono de numeração maior do que 5, não é necessária a colocação da designação do grupo final (letra grega) da molécula.

c) se a remoção acontecer no carbono de numeração igual ou menor do que 5, é considerado como grupo final o grupo acíclico  $\psi$ .

d) o prefixo "diapo" é precedido por duas numerações dos locais de remoção.

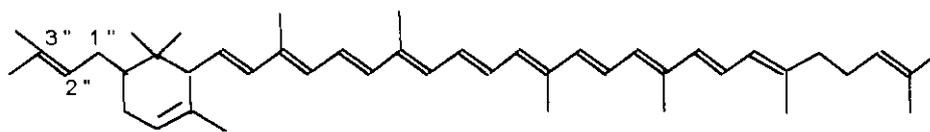
e) quando, em um composto diapo, os dois grupos finais tenham diminuído em desigualdade, a menor numeração (indicando a localização de remoção) associada ao prefixo diapo é a numeração não plicada.

14) Carotenóides superiores - a nomenclatura dos carotenóides superiores (classe de hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados com mais de 8 unidades isoprênicas em suas estruturas moleculares) é praticada de forma semelhante à dos carotenóides  $C_{40}$ , onde a numeração destes é mantida. As unidades isoprênicas adicionadas às estruturas dos  $C_{40}$  são consideradas como substituintes e suas denominações são executadas com base nas normas gerais da química orgânica (Figura 27).

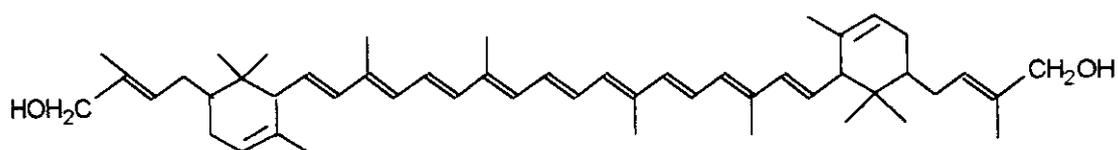
#### 15) Estereoquímica

a) configuração absoluta dos centros quirais - é indicada pelo uso da conversão R e S, onde os símbolos são colocados antes do nome específico do carotenóide, com as correspondentes localizações (Figura 28).

b) configuração absoluta dos compostos alênicos - a configuração próxima aos grupos alenos, quando conhecida pode ser designada (Figura 29).



2 - (3 - Metil - 2 - butenil) - ε, ψ - caroteno



2 - 2' - Bis (4 - hidróxi - 3 - metil - 2 - butenil) - ε, ε - caroteno

FIGURA 27 - Carotenóides superiores.

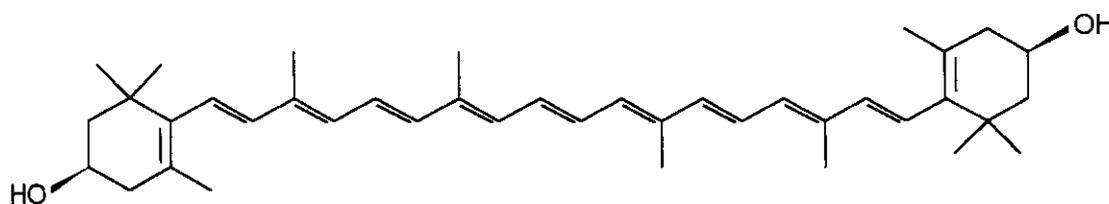


FIGURA 28 - (3 R, 3' R) - β, β - caroteno - 3, 3' diol.

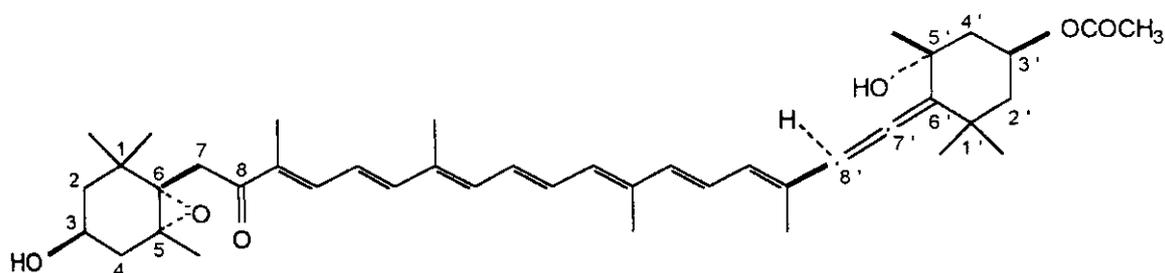


FIGURA 29 - (3'S, 5'R, 6'R) - 3' - Acetóxi - 5, 6 - epóxi - 3, 5' - dihidróxi - 6', 7' - didesidro - 5, 6, 7, 8, 5', 6' - hexaidro - β, β - caroten - 8 - ona.



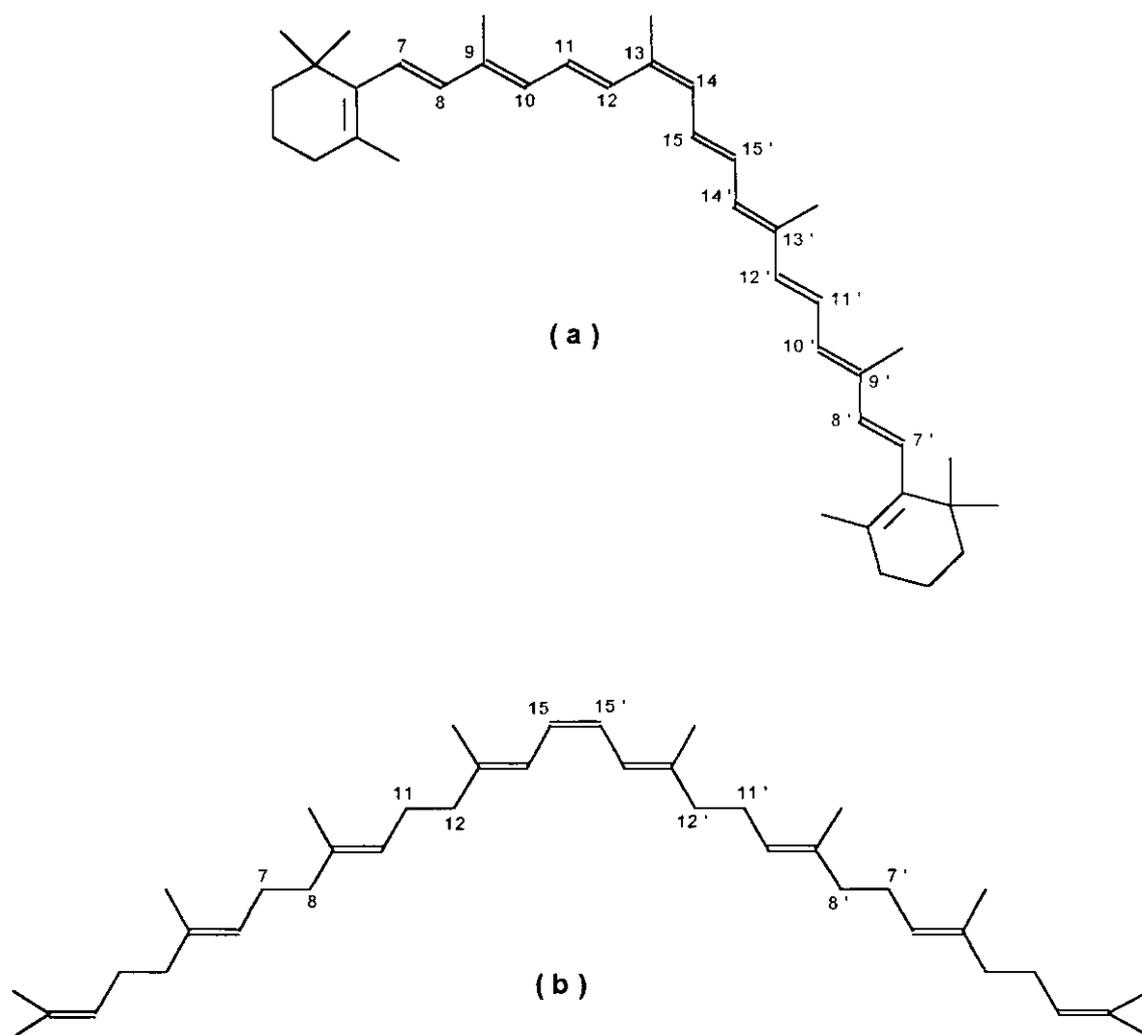


FIGURA 30 - a) 13 - *cis* -  $\beta, \beta$  - caroteno; b) 15 - *cis* - 7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12' - octaidro -  $\psi, \psi$  - caroteno.

## 2.7 Conversão dos carotenóides para vitamina A

Os trabalhos de revisão de OLSON (1989) e TEE (1992) discutem teorias, em parte ainda não bem estabelecidas, sobre a transformação dos carotenóides em vitamina A nos mamíferos, tomando como base na postulação da degradação biológica do  $\beta$ -caroteno admitida por GLOVER e REDFEARN (THOMMEN, 1971). Acredita-se que o mecanismo de conversão pode ocorrer por meio de duas formas: pela clivagem simétrica e pela clivagem assimétrica.

As pesquisas utilizando  $\beta$ -caroteno e ratos como animais experimentais comprovaram que a clivagem simétrica ocorre pela reação oxidativa, onde os átomos de carbono centrais (15, 15') do caroteno reagem com oxigênio molecular formando o composto transitório 15, 15'-peróxido de  $\beta$ -caroteno, o qual rapidamente rompe-se fornecendo duas moléculas de retinal (Figura 31). A clivagem requer a enzima denominada  $\beta$ -carotenóide-15,15'-dioxigenase<sup>12</sup>; sua ação é realizada principalmente na mucosa intestinal, onde após a absorção do carotenóide, cliva-o para vitamina A, na forma aldeído, isto é, retinal. A enzima é encontrada, além do intestino delgado, em outros órgãos (fígado, rins) de ratos e de outras espécies de animais (coelhos, porcos), inclusive de humanos.

Desta forma, sem dúvida, a atividade enzimática da  $\beta$ -carotenóide-15,15'-dioxigenase do organismo animal é maior do que a atividade máxima desta enzima no intestino, porém esta é suficiente para cumprir a função de conversão. Apresenta também a característica de não ser rápida na sua capacidade de atuação, o que dificilmente promoverá ao organismo uma hipervitaminose A. Além do mais, esta enzima (intestino) é afetada pela quantidade de proteína consumida e é regulada pelo tipo e quantidade presente da vitamina A pré-formada (OLSON, 1989; BRITTON, 1992).

---

<sup>12</sup> Outros autores se referem a essa enzima como:  $\beta$ -caroteno-15,15'-oxigenase (ISLER, 1971);  $\beta$ -caroteno-15,15'-dioxigenase (TEE, 1992);  $\beta$ -carotenóide-15,15'-dioxigenase (OLSON, 1989) e 15,15'-dioxigenase (BAUERNFEIND, 1972).

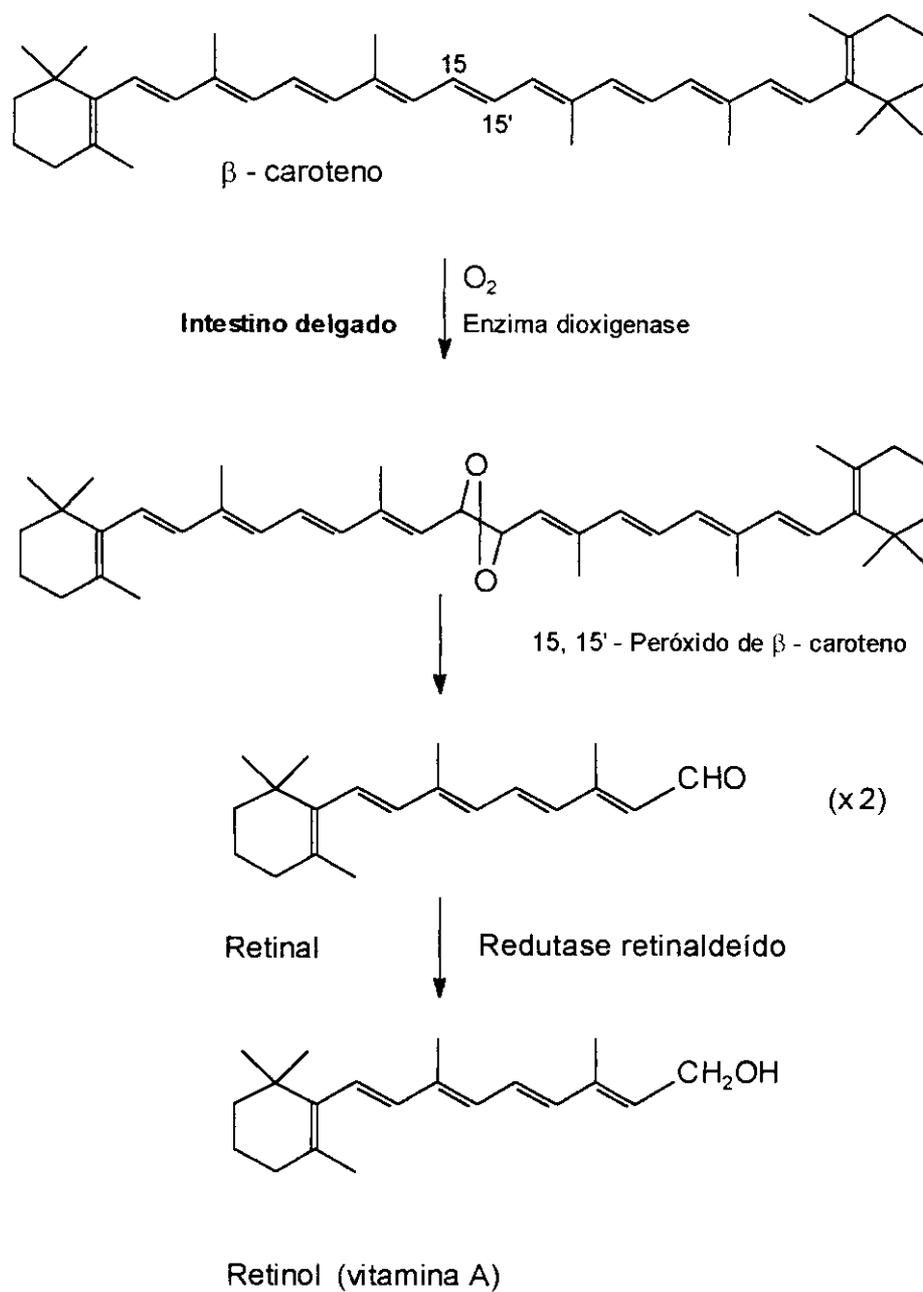


FIGURA 31 - Conversão de  $\beta$  - caroteno para retinol pela clivagem simétrica.  
Referências: THOMMEN (1971); OLSON (1989); TEE (1992).

A  $\beta$ -carotenóide-15,15'-dioxigenase, além de catalisar a reação de formação de retinal proveniente de  $\beta$ -caroteno, cliva também para retinal outros carotenóides e alguns  $\beta$ -apo-x-carotenais (10', 8' e 4'). É mais rápida na clivagem dos apo-carotenais do que na clivagem do  $\beta$ -caroteno (THOMMEN, 1971; PITT, 1971) e em sua presença os ácidos  $\beta$ -apo-carotenóicos atuam como pobres substratos (OLSON, 1989); ela não ataca "in vitro" 5,6:5',6'-diepóxido- $\beta$ -caroteno e 5,6-monoepóxido- $\beta$ -caroteno, apesar deste último composto ter um anel  $\beta$ -ionona não substituído e no organismo de ratos demonstrar ter atividade biológica, contrapondo a sua provável especificidade de clivar somente aqueles carotenóides que seguem a regra de ter a metade da estrutura molecular correspondente à estrutura do retinol. No entanto, cliva 3,4,3',4'-tetradesidro- $\beta$ -caroteno, de modo lento, originando 3,4-desidroretinal, levando a concluir que certos aspectos da conversão por meio desta enzima ainda se encontram obscuros (PITT, 1971). Independente destes fatores, acredita-se que a enzima  $\beta$ -carotenóide-15,15'-dioxigenase é o carro-chefe da conversão dos carotenóides para vitamina A.

Já o mecanismo da clivagem assimétrica tornou-se provável pelo aparecimento "in vivo" de  $\beta$ -apo-carotenal formado após a administração de  $\beta$ -caroteno em ratos; pela transformação "in vivo", em alguns casos, dos compostos apo-carotenais de cadeias mais longas para compostos de menor comprimento (OLSON, 1989) e pela observação que nas células animais ocorre a conversão quantitativa de apo-carotenal para o equivalente ácido (THOMMEN, 1971). Do mesmo modo, o mecanismo tornou-se viável para as plantas e alguns microorganismos, pelo fato de que nestes seres vivos é comum a presença de apo-carotenóides.

Teoricamente, a clivagem assimétrica se daria pela oxidação casual das outras duplas ligações existentes nas moléculas dos carotenóides ativos (exceto na dupla ligação central 15, 15') produzindo  $\beta$ -apo-carotenais ou os

correspondentes ácidos carotenóicos com cadeias de diferentes comprimentos (C<sub>22</sub> a C<sub>30</sub>) (BRITTON, 1992) e outros aldeídos menores (OLSON, 1989). Como exemplo, uma molécula de  $\beta$ -caroteno poderia converter-se em  $\beta$ -apo-8'-carotenal e ciclocitral (Figura 32). Em seguida, os  $\beta$ -apo-carotenais ou ácidos carotenóicos resultantes são submetidos a uma nova oxidação, rendendo uma molécula de retinal, ou seja, por meio desta clivagem uma molécula de  $\beta$ -caroteno produziria apenas uma molécula de retinal.

Apesar das evidências mencionadas anteriormente, o mecanismo casual ainda não foi confirmado, visto que nenhuma enzima com especificidade de rompimento assimétrico foi identificada e caracterizada (OLSON, 1989). Somando a isto, por estar a quantidade de  $\beta$ -apo-carotenal provida de  $\beta$ -caroteno sempre presente em mínimas doses no sangue ou "in vitro", deduz-se que a clivagem assimétrica, se ocorrer, não pode ser considerada como uma via fundamental na obtenção de retinol, mas sim, um mecanismo secundário.

Como já mencionado, o termo vitamina A refere-se aos compostos que apresentam a atividade biológica do retinol (Figura 9). Assim, o suprimento de retinol advindo da dieta alimentar é devido aos carotenóides ativos e/ou aos retinóides (vitamina A pré-formada em suas várias formas, prevalecendo nos alimentos, as esterificadas). As fontes dos carotenóides são principalmente os vegetais, frutas, raízes e sementes e as dos retinóides são os alimentos de origem animal e os comercialmente enriquecidos.

Após o consumo dos alimentos, tanto os carotenóides como os retinóides são absorvidos no intestino, em conjunto com outros lipídeos. Os carotenóides estão presentes nos alimentos na forma livre, dissolvidos em gotículas de lipídeos, ou complexados com proteínas e lipoproteínas (ARIMA, 1987). O processo de liberação dos que se encontram complexados inicia-se no estômago, terminando no intestino delgado (duodeno) por ação enzimática (pepsina no estômago e tripsina e quimotripsina no intestino). O mesmo procedimento ocorre

com os retinóides e, uma vez liberados, a gordura ingerida na alimentação ajuda a solubilização e o transporte tanto dos carotenóides como da vitamina A pré-formada (TEE, 1992).

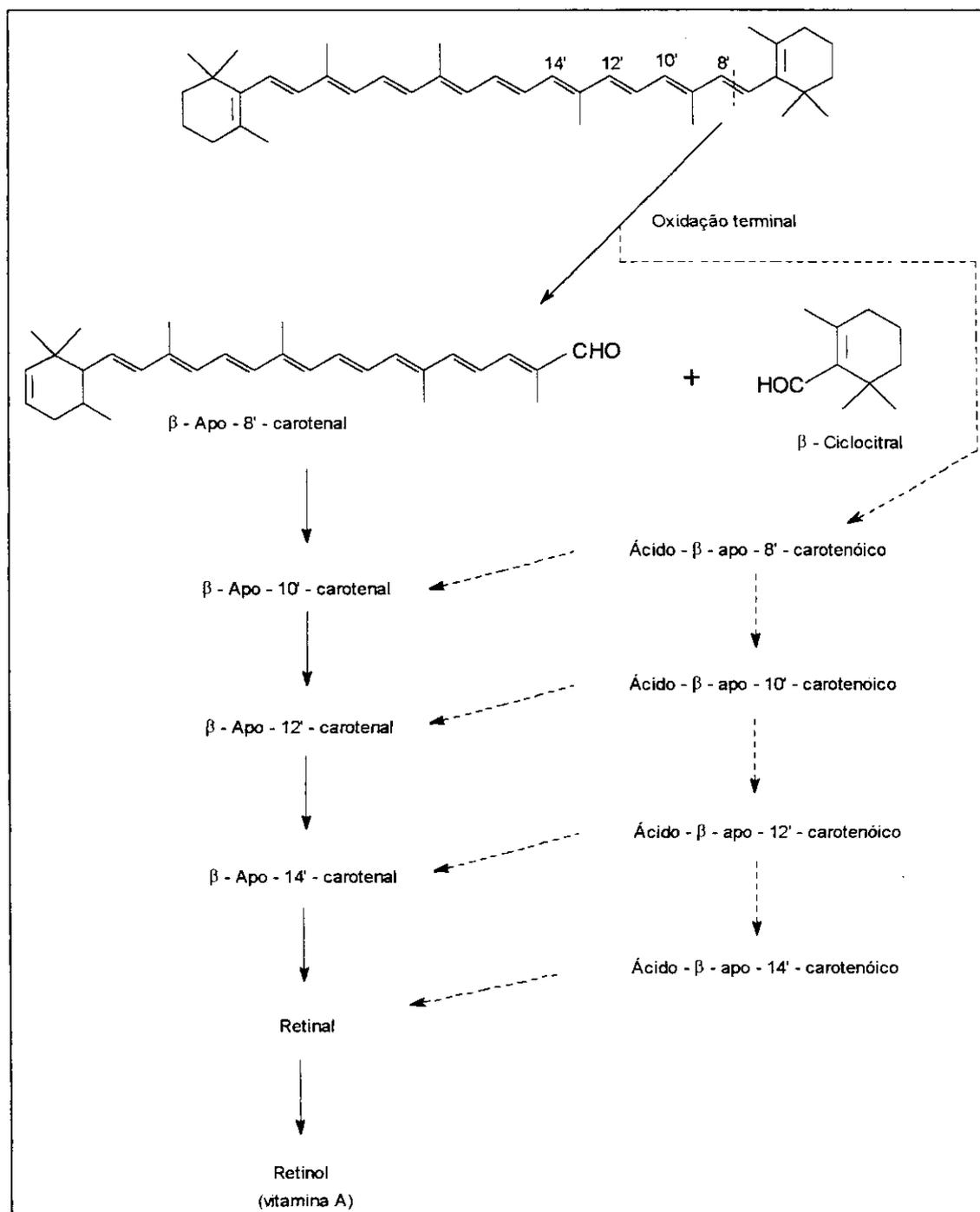


FIGURA 32 - Conversão do  $\beta$ -caroteno para retinol pela clivagem assimétrica. Referências: OLSON (1983); THOMMEN (1971).

O percurso da vitamina A no corpo, desde a absorção [1] até a formação dos metabólitos, é demonstrado na Figura 33. Os números em colchetes relacionam as transformações mencionadas no texto.

Ao realizar-se, então, a digestão lipídica pelos sais biliares e enzimas pancreáticas no lume intestinal, há a liberação de vários produtos, os quais interagem com os sais de bile e colesterol formando as micelas mistas que auxiliarão, em etapa posterior, na absorção da vitamina A e dos carotenóides. Durante este processo de liberação, os retinóides, na forma de éster, principalmente palmitato de retinila, são hidrolisados, ou pelas enzimas pancreáticas ou por uma enzima hidrolítica, resultando retinol [2]. As micelas formadas solubilizam o retinol e os carotenóides livres que são absorvidos pelas células da mucosa intestinal [3], com exceção dos sais biliares<sup>13</sup> (LAMBERT *et al.*, 1985; TEE, 1992).

Outro processo importante realizado na mucosa intestinal após a absorção, cujos mecanismos são descritos acima, é a conversão dos carotenóides a retinal [4], seguida de uma redução a retinol catalisada pela enzima redutase retinaldeído [5] (LAMBERT *et al.*, 1985). Uma pequena quantidade de retinal formada nesta conversão é oxidada para ácido retinóico [6] que passa para o sangue portal<sup>14</sup> [7], mas a maioria é reduzida para retinol (PITT, 1971).

Ainda nas células intestinais, os retinóis absorvidos, providos pela via carotenóides ou via retinóides, são novamente esterificados com ácidos graxos de cadeia longa [8], em predominância com ácido palmítico, seguido por esteárico e oléico. Os ésteres formados são incorporados às partículas do quilomicra (gotículas em suspensão de triacilgliceróis altamente emulsionadas), os quais compõem a linfa [9], chamada de quilo (tem aparência leitosa depois de uma

---

<sup>13</sup> Os sais biliares são absorvidos após a absorção dos produtos da digestão lipídica, retornando ao fígado para de novo serem usados. Circulam incessantemente entre o fígado e o intestino delgado.

<sup>14</sup> Relativo à veia porta.

dieta rica de gordura, devido aos quilomicra). O quilo, por sua vez, é absorvido pelos vasos linfáticos, conduzido pelo duto torácico e drenado na veia subclávia (Figura 34). Assim, os ésteres associados a lipoproteínas de baixa densidade atingem o fluxo sanguíneo, sendo transportados para o fígado **[10]** (BRITTON, 1992; TEE, 1992). Entretanto, uma parte dos retinóis absorvidos no intestino (10%) é convertida em ésteres, é conduzida diretamente pela veia porta para o fígado **[11]** (Figura 34) (LAMBERT *et al.*, 1985). Neste órgão, os ésteres de retinila absorvidos, são hidrolisados ao serem transferidos do plasma sanguíneo **[12]**. Em seguida, os excedentes do retinol não consumidos pelas necessidades imediatas do corpo são reesterificados (de novo predominando palmitato) e armazenados com outros lipídeos, polipeptídeos e carboidratos formando complexas macromoléculas **[13]** (TEE, 1992).

O fígado pode armazenar retinol (na forma éster) em doses suficientes por vários meses (30 µg de retinol protege uma criança por 6 meses) (LEHNINGER, 1989). O armazenamento é requerido para que o fígado exerça a função de manter um constante nível de retinol no sangue, a fim de abastecer os tecidos periféricos, mesmo se a dieta for deficiente em vitamina A. Conseqüentemente, quando os órgãos do corpo necessitam de retinol para cumprir suas ações, o fígado, após hidrólise enzimática<sup>15</sup> dos ésteres **[14]**, libera-os (na forma álcool), do complexo de estocagem, para o plasma, onde são transportados para os tecidos por uma proteína com especificidade de transporte, a RBP<sup>16</sup> (retinol-binding protein), que está complexada no plasma a uma segunda proteína, a prealbumina **[15]** (PITT, 1971; LAMBERT *et al.*, 1985; TEE, 1992). A concentração da RBP no plasma exerce ação decisiva sobre a normalização do nível de retinol no sangue e sobre seu transporte para os tecidos. Por outro lado, ela é influenciada pelas condições nutricionais da dieta, em especial, pela ingestão inadequada de proteína que retardará o metabolismo protéico do organismo e, deste modo, a sua própria formação.

---

<sup>15</sup> Éster retinil hidrolase, presente no complexo de estocagem.

<sup>16</sup> Retinol ligado à proteína alfa globulina. Revela-se como holo-RBP (ligada a uma molécula de retinol na proporção de 1:1) e como apo-RBP (livre de retinol).

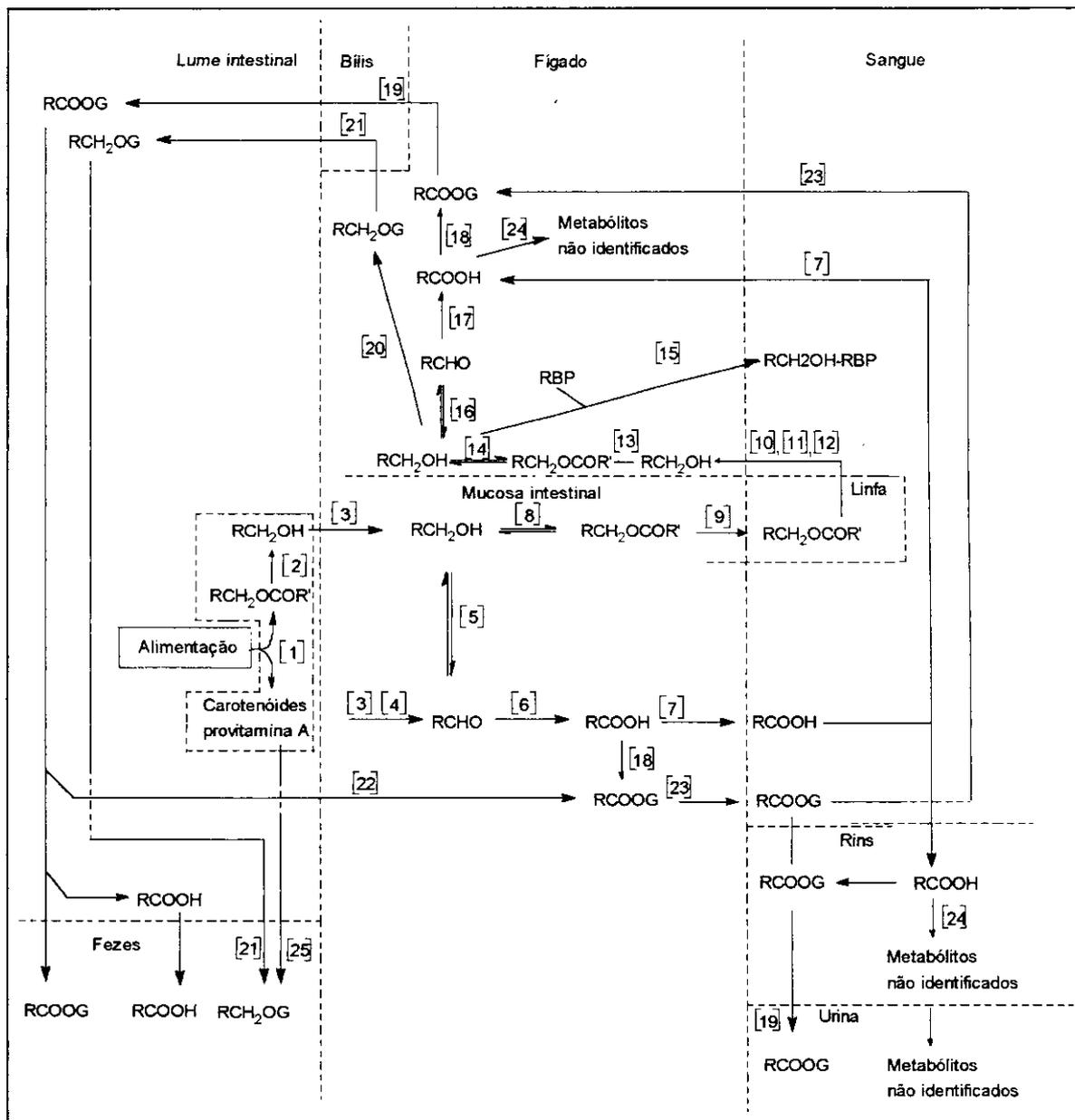
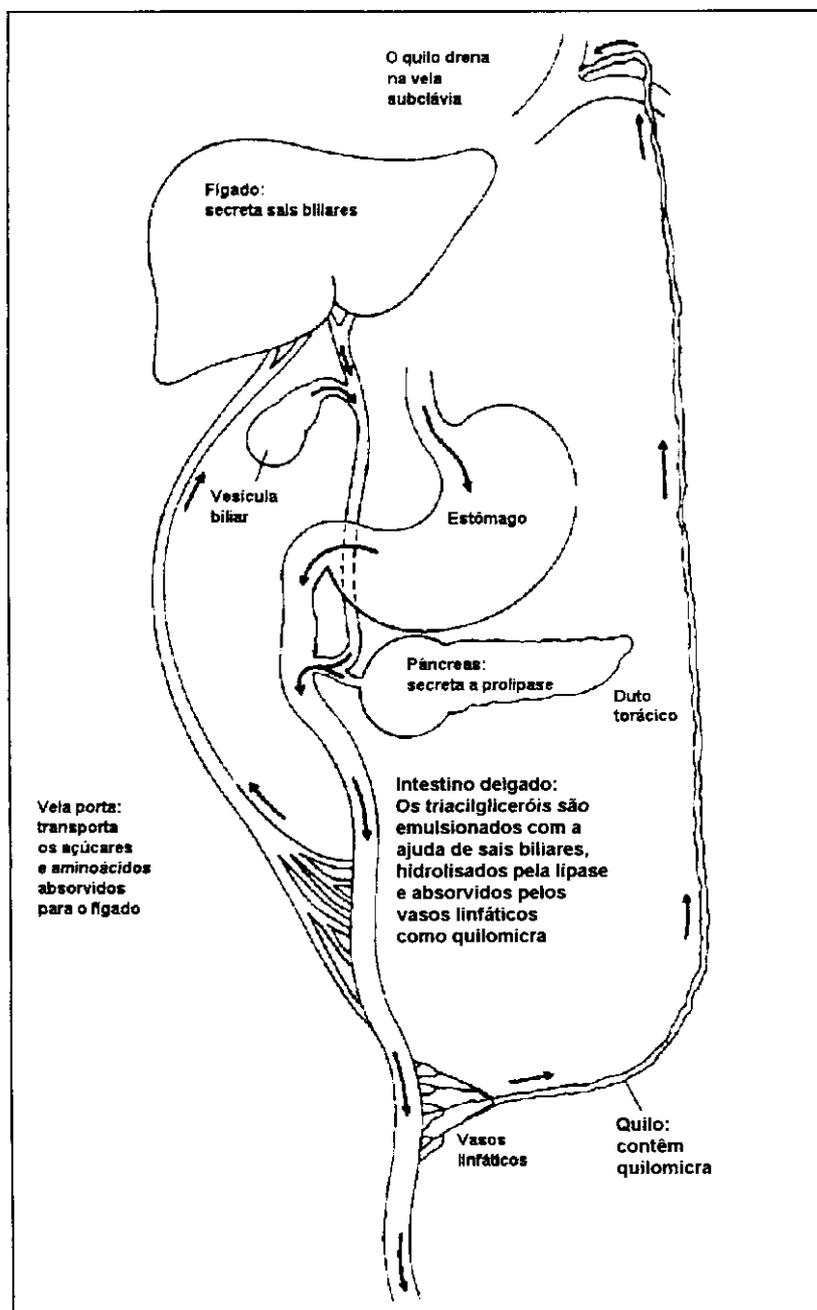


FIGURA 33 - Esquema do metabolismo da vitamina A no corpo animal. Adaptado de PITT (1971). RCH<sub>2</sub>OH = retinol, RCH<sub>2</sub>OCOR' = ésteres de retinila, RCH<sub>2</sub>OG = β - glicuronato de retinila, RCHO = retinal, RCOOH = ácido retinóico, RCOOG = β - glicuronato de retinoila, RBP = retinol ligado à proteína.



Referência: LEHNINGER (1989).

FIGURA 34 - Desenho esquemático dos elementos da absorção e digestão das gorduras.

No fígado, retinol pode ser oxidado, em seqüência, para retinal e ácido retinóico [16, 17]. A conversão de retinol para retinal é recíproca, contudo, de retinal para ácido retinóico, é irreversível. Uma vez formado, o ácido retinóico, ao contrário de retinol, não é acumulado em nenhuma parte do organismo, desaparecendo em pouco tempo do corpo; une-se com ácido glicurônico, convertendo-se em glicuronato que é excretado na urina e na bile [18, 19]. O seu transporte no plasma, quando absorvido no intestino na forma livre ou ali metabolizado, é encaminhado diretamente para o fígado percorrendo o caminho da veia porta, complexado com albumina [7] (PITT, 1971; LAMBERT et. al., 1985).

Da mesma forma, retinol pode produzir, em menor dimensão e, portanto, de modo mais lento, seu correspondente glicuronato [20], que é excretado na bile e naturalmente pelas fezes [21]. Alguns glicuronatos podem ser reabsorvidos no intestino, seguindo a circulação enteroepática [22, 23].

Outros produtos de degradação da vitamina A são produzidos [24], porém ainda não identificados; no momento, tem-se uma mínima compreensão dos caminhos de formação dos derivados, incluindo suas mútuas relações e atividades biológicas. Dos metabólitos excretados são reconhecidos o ácido retinóico e os glicuronatos; retinol não é fixado pela urina e, quando altos teores de vitamina A são ingeridas, certa proporção é excretada nas fezes de forma inalterada [25].

## **2.8 Absorção e fatores influenciáveis**

O ser humano absorve indiscriminadamente todos os carotenóides oferecidos na dieta. Parte são clivados e parte são absorvidos íntegros (do total de  $\beta$ -caroteno absorvido, ao redor de 20 a 30% são na forma integral; ARIMA, 1987). Neste caso, carotenos são também transportados para o fluxo sanguíneo pelas lipoproteínas de baixa densidade, enquanto que as xantofilas são

transportadas associadas com lipoproteínas de alta densidade (BRITTON, 1992). No corpo poderão ser depositados em todos os tecidos, em especial nos adiposos e no fígado e, deste modo, são encontrados na placenta, tecido do coração, nervos, pâncreas e outros órgãos, bem como na gordura do leite materno (OLSON, 1989; TEE, 1992).

Em geral, são ingeridas quantidades mínimas (miligramas) de carotenóides por dia, durante toda a vida, e os humanos, por acumulá-los em seus depósitos de gordura, evidencia a realidade de que a gordura de um indivíduo adulto tem cor amarela e as das crianças serem quase branca (GOODWIN, 1954), talvez, também, ocasionada pela ineficiência das crianças em absorver carotenos (TEE, 1992). Se consumidos em quantidades maiores (dezenas de miligramas) por dia e por período prolongado (várias semanas) resultará na carotenodermia<sup>17</sup>. No entanto, esta não se caracteriza como enfermidade, pois é inofensiva e reversível, desaparecendo após a suspensão das fontes alimentares ricas em carotenóides. Apesar de não fazer parte do sangue humano,  $\beta$ -caroteno pode permanecer no mesmo por poucos dias, contudo, cantaxantina pode persistir por um período considerável, de 6 a 12 meses, se ingerida em altas doses (BRITTON, 1992).

Nada se conhece sobre o mecanismo de degradação dos carotenóides nos seres humanos (BRITTON, 1992) e pouco se sabe das possíveis atuações no organismo dos carotenóides não precursores de vitamina A, a não ser que atuam como antioxidantes (OLSON, 1989).

Quanto à absorção e metabolismo dos carotenóides, nenhum animal serve como modelo ideal para o homem, pois há diferenças significativas de acordo com a espécie (BRITTON, 1992). Mesmos os ratos e camundongos, que são usados como instrumentos de respostas dos muitos trabalhos realizados sobre o tema,

---

<sup>17</sup> Coloração amarelada da pele, em especial dos pés e mãos. Carotinemia, hipercarotenemia - outros termos usados para a indicação da coloração da pele.

são considerados pobres absorvedores e, dentro da classe dos mamíferos<sup>18</sup>, diferem dos humanos por não pertencerem à mesma classificação, no que se refere ao armazenamento de carotenóides no corpo. Encontram-se no grupo que não acumula carotenóides em seus tecidos gordurosos e os pigmentos estão ausentes do plasma sanguíneo, podendo, às vezes, ser encontrados em mínimas quantidades (traços) no fígado dos animais. Este fato deve-se à específica propriedade que estes animais têm, de apresentarem um eficiente mecanismo de conversão para vitamina A dos carotenos absorvidos na parede intestinal.

Gado absorve melhor carotenos do que xantofilas; a situação é inversa com as aves, onde os pigmentos (xantofilas, em especial) são transportados e estocados no fígado, penas, gemas dos ovos, gordura do corpo, pele e canelas. As aves se assemelham aos peixes e invertebrados, por terem, além da capacidade de converter carotenos em vitamina A (que nas aves, é estocada no fígado e ovos), apresentam também a particularidade de alterar carotenóides absorvidos da dieta formando estruturas oxigenadas (astaxantina, cantaxantina e outras), estocando-as em alguma parte do corpo (GOODWIN, 1954), as quais geralmente lhes conferem coloração típica. Tais modificações podem ser melhores visualizadas no esquema de metabolismo proposto por BAUERNFEIND (1972) para os animais marinhos (Figura 35).

Apesar dos seres humanos apresentarem a característica de absorverem e estocarem carotenóide no organismo de forma não seletiva, são considerados, como os demais mamíferos, pouco eficientes na absorção destes pigmentos, pois considerável quantidade dos carotenóides ingeridos com os alimentos é excretada nas fezes. Mesmo em pequenas doses ingeridas de  $\beta$ -caroteno, cerca de 1 a 2  $\mu\text{g}$ / dia, perto de 20% são excretados nas fezes (GOODWIN, 1954). Em condições normais do aparelho gastrintestinal, isto não acontece com a vitamina

---

<sup>18</sup> Mamíferos podem ser divididos em três grupos, de acordo com os pigmentos acumulados nos tecidos gordurosos de seus corpos, como: a) os que acumulam carotenóides (carotenos e xantofilas). Exemplo - humanos; b) os que acumulam preferencialmente carotenos. Exemplo - gados, cavalos, ovelhas e cervos e c) os que não acumulam nenhum carotenóide. Exemplo - cabras, ratos, coelhos, lebres e porcos. Referência: GOODWIN (1954).

A pré-formada que é bem absorvida; da quantidade ingerida, acima de 90% é absorvida (TEE, 1992).

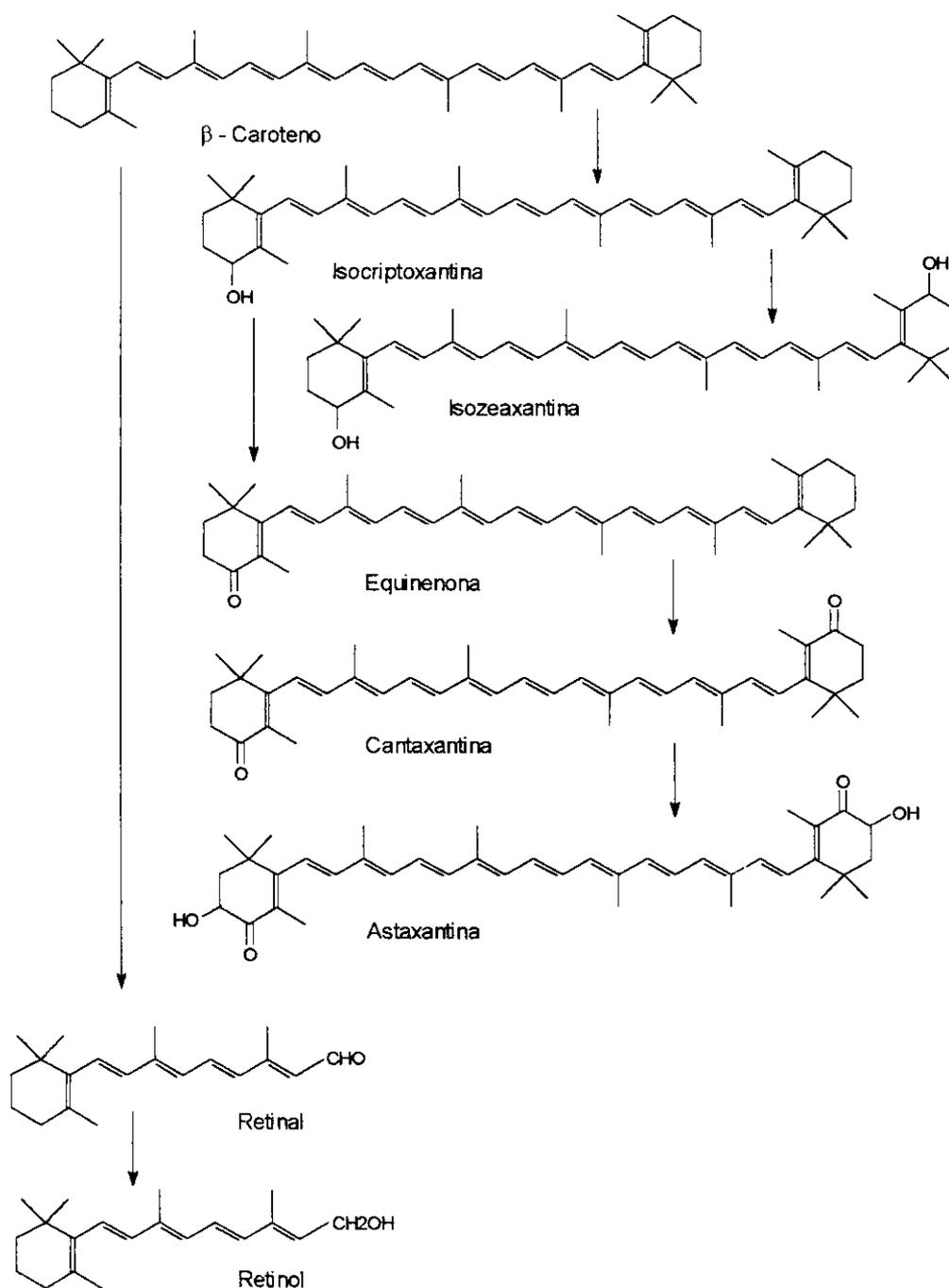


FIGURA 35 - Esquema do metabolismo de conversão do  $\beta$ -caroteno para vitamina A e para estruturas oxicarotenóides em animais marinhos, semelhante ao metabolismo de aves. Referência: BAUERNFEIND (1972).

Vários e diferenciados são os fatores que afetam a absorção dos carotenóides nos humanos e, como consequência, influenciam a atividade biológica dos compostos precursores de vitamina A. Tais fatores são: a) os de ordem física - relacionados com a estrutura molecular dos compostos, tais como, a isomerização *trans-cis* e outras mudanças na estrutura da molécula; segundo GOODWIN (1954), com a rotação *trans-cis* há a perda da forma reta dos carotenóides, causando dificuldades para o sistema enzimico envolvido no transporte e conversão dos mesmos, em reconhecer as moléculas alteradas, tornando os isômeros *cis* menos ativos do que os correspondentes compostos *todo-trans*; b) fatores relacionados com a fonte alimentar -  $\beta$ -carotenos provenientes de vegetais são menos absorvidos, ao passo que,  $\beta$ -caroteno puro é melhor absorvido. Isto se deve ao fato que a disponibilidade dos carotenóides depende dos fatores de digestibilidade ligados à natureza dos vários tipos de alimentos, mesmo porque nutrientes provindos de vegetais não cozidos e não finamente divididos são mais difíceis de serem absorvidos. TEE (1992) relata, não discutindo as causas, que carotenos de vegetais de folhas verdes são duas ou três vezes melhores absorvidos do que os presentes em vegetais de raízes amarelas ou vermelhas, como a cenoura. Menciona também que há uma grande variação no nível de absorção, dependendo da fonte de vegetal, obtendo níveis tão baixos como 5% bem como níveis de 20 a 45% para vegetais folhosos, raízes e tubérculos; c) nutrientes que auxiliam a absorção - a dispersão e transporte dos carotenóides e mesmo da vitamina A pré-formada dependem de outros nutrientes presentes na dieta alimentar. Assim, o teor de gordura deve estar em níveis suficientes para solubilizar e transportar os carotenóides do estômago para a parede intestinal; há a indicação que a qualidade dos lipídeos (grau de saturação, estado de oxidação e comprimento da cadeia) influenciam na absorção. GOODWIN (1954), menciona que manteiga e margarina são melhores veículos do que óleo de semente de algodão. Outros componentes que facilitam a absorção são os agentes emulsificantes, como a lecitina; o fornecimento adequado de sais de biles pelo organismo pois, com a digestão parcial das gorduras, as vitaminas

lipossolúveis não são completamente absorvidas; a presença na dieta de ácido ascórbico e de óleos de sementes que contêm  $\alpha$ -tocoferol, os quais agem sobre a vitamina A como protetores à oxidação; presença em níveis apropriados de proteína e peptídeos, para formar as enzimas do trato digestivo e as enzimas relacionadas com a absorção e transporte dos carotenóides e retinol. Um outro fator é que proteínas solúveis auxiliam na dispersão da vitamina A; d) a baixa solubilidade dos carotenóides - a baixa absorção dos carotenóides em relação a vitamina A é devido, talvez, à limitada solubilidade dos carotenóides em gordura (vitamina A é mais solúvel em gordura) e em outros agentes auxiliares da digestão, como os sais de bile. Sabe-se da dificuldade de se fazer uma solução estável de  $\beta$ -caroteno em óleo vegetal, em concentração maior do que 0,05-0,1%. Acontece também que os tecidos vegetais comumente apresentam maiores proporções de carotenóides do que lipídeos dificultando, assim, a solubilidade total dos pigmentos; e) constituintes da dieta que afetam ou inibem a absorção - a presença de óleos minerais reduz a absorção dos carotenóides, visto que os pigmentos são facilmente solúveis nos óleos que não são absorvidos pelo organismo. Nitritos presentes na dieta agem como pró-oxidantes; f) condições de saúde do organismo - a absorção é reduzida quando há disfunção da tireóide, febres, icterícia, perturbações intestinais, doenças intestinais e pancreáticas onde há uma deficiência da absorção de gorduras, presença de parasitas e doenças em geral.

O  $\beta$ -caroteno pode ser tomado como um bom exemplo da influência dos fatores acima relacionados sobre a absorção e no desempenho da sua atividade biológica. Observando a molécula do  $\beta$ -caroteno e assumindo a clivagem simétrica, uma molécula da provitamina poderia dar duas moléculas de vitamina A e, desta forma, ter sua atividade dobrada. O  $\beta$ -caroteno, no entanto, não é bem aproveitado no organismo humano, como é o retinol. A sua eficiência de conversão, segundo TEE (1992), atinge, quando muito, 50% da quantidade absorvida, quando os níveis da quantidade ingerida são muito baixos. Estudos indicam que tanto a conversão quanto a absorção do  $\beta$ -caroteno diminuem com o

aumento da ingestão deste pigmento. Ao mesmo tempo, TEE (1992) relata que a Organização Mundial de Saúde (OMS) tabulou estudos de absorção de carotenos em humanos, os quais revelaram grandes variações. Portanto, a partir destes dados foi assumido, com a intenção prática, que a melhor aproximação para a estimativa da absorção de  $\beta$ -caroteno nos seres humanos seria um terço da quantidade ingerida e, assim, calculou-se que um sexto da quantidade de  $\beta$ -caroteno dos alimentos convertem-se em vitamina A no organismo.

## **2.9 Unidades assumidas para expressar e estimar a atividade vitamina A em alimentos**

No início dos estudos sobre vitamina A e compostos correlacionados, a avaliação da atividade biológica das substâncias, que possivelmente apresentavam esta propriedade, eram esclarecidas por meio de testes biológicos usando, geralmente, cobaias intactas, alimentadas com tais substâncias. Com o decorrer das investigações, eram observadas as mudanças ocorridas nos tecidos, sangue, fígado, etc., ou aumento do peso corpóreo. Porém os resultados destes estudos revelaram-se não coincidentes devido aos diferentes tipos de ensaios.

Ao mesmo tempo, tendo em vista de que, nas diversas fontes alimentares, existem variações quanto aos tipos de compostos que exercem atividade vitamina A (pré-formados e provitamínicos), em concentrações e atividades diferentes, foi necessário estabelecer unidades de grandeza com as quais pudessem expressar um valor de vitamina A comum a todas estas substâncias e permitissem, portanto, a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos.

Assim, a atividade vitamínica A foi enunciada pela primeira vez como "unidades internacionais" (UI). Estas unidades foram definidas como a dose requerida para produzir um ganho de peso de 3 g/semana em cobaias jovens entre a quarta e oitava semana de vida.

Contudo, com o avanço das técnicas analíticas, resultando em novos conhecimentos, e após minuciosa avaliação estatística das experiências biológicas de vitamina A e  $\beta$ -caroteno no crescimento de cobaias, o "Expert Committee on Biological Standardization" da Organização Mundial da Saúde pode estabelecer a UI em termos de uma grandeza exata, ou seja, definiu que uma UI equivaleria a 0,3  $\mu\text{g}$  de retinol, 0,344  $\mu\text{g}$  de acetato de retinila, 0,55  $\mu\text{g}$  de palmitato de retinila ou 0,6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno. Para esta equivalência considerou uma atividade biológica para o  $\beta$ -caroteno de 50% em relação à atividade do retinol, o qual é considerado ter 100% de biopotência no corpo humano (ARIMA, 1987; TEE, 1992).

Entretanto, em 1967, a OMS recomendou a suspensão da terminologia UI como unidade de expressão da atividade de vitamina A, uma vez que poderia ser usado como padrão de referência, unidades de peso, isto é, microgramas de retinol cristalino<sup>19</sup>. Além disso, a organização relatou a discussão sobre a atividade biológica relativa de vários compostos e o cálculo do valor de vitamina A das dietas, levando em consideração a real absorvidade e a conversão dos carotenóides para vitamina A (TEE, 1992).

Sabe-se, porém, que o metabolismo dos carotenóides diferencia-se com a espécie, sendo a conversão em ratos considerada como 100%. São responsáveis pela desigualdade da atividade biológica a diferença da superfície do trato digestivo e a eficiência das enzimas digestivas das espécies (ARIMA, 1987). Esta diferença do metabolismo pode ser visualizada na Tabela 4, a qual demonstra as proporções em massa da equivalência de conversão de  $\beta$ -caroteno para vitamina A em alguns animais, incluindo o homem. Nota-se portanto, que as proporções, determinadas por vários órgãos de pesquisa, apresentam valores discordantes para algumas espécies.

---

<sup>19</sup> Segundo TEE (1992), o uso da UI causou certa confusão entre os cientistas que a utilizaram para estimar o valor de vitamina A em seus experimentos.

TABELA 4 - Proporções da atividade real de  $\beta$ -caroteno e retinol para alguns animais.

Animal	Órgão de pesquisa	mg de $\beta$ -caroteno equivalente a 1 mg de retinol
rato	Internacional	2
cão	NAS-NRC	4 ou 8
aves	NAS-NRC	2
	NCAN	3
	ARC	6
cavalo	NAS-NRC	6 - 10
	NCAN	7
gado de corte	NAS-NRC	8,3
	ANRC	8
	NCAN	7
homem	MRC	6
	NAS-NRC	4
	BMA	6
	CCN	8
	NCAN	7

Referência: BAUERNFEIND, 1972.

NAS-NRC - National Academy of Sciences, National Research Council - Estados Unidos.

NCAN - National Committee on Animal Nutrition - Canadá.

ARC - Agricultural Research Council - Grã Bretanha.

ANRC - Animal Nutrition Research Council - N. America.

MRC - Medical Research Council - Grã Bretanha.

BMA - British Medical Association.

CCN - Canadian Council on Nutrition.

A partir destas colocações e assumindo, como descrito anteriormente, que no ser humano, somente 33% dos carotenóides ingeridos são absorvidos e que, desta proporção, somente 50% são convertidos para vitamina A, a OMS sugeriu que 1  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno teria a mesma atividade de 0,167  $\mu\text{g}$  de retinol ou equivaleria a 0,56 UI de vitamina A<sup>20</sup>, alterando assim, a equivalência entre as unidades utilizadas até aquele momento. A OMS considerou também a atividade total dos demais carotenóides precursores, estimando como a metade da biopotência do  $\beta$ -caroteno, já que as suas atividades variam amplamente em intensidade.

Em seguida, em 1980, a United States National Academy of Sciences (NAS) propôs o conceito "Equivalente Retinol" (ER), expresso em microgramas, além de definir a sua equivalência com a UI, conforme apresentado a seguir:

- 1 ER = 1  $\mu\text{g}$  de retinol;
- = 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno;
- = 12  $\mu\text{g}$  de outros carotenóides precursores;
- = 3,33 UI de atividade vitamina A .

Enfim, a partir destes conceitos pode-se ter uma melhor estimativa do valor de vitamina A total de um alimento ou da dieta, em valores de massa, pela soma dos teores de retinol pré-formados aos valores de retinol provindos dos carotenóides ativos.

---

<sup>20</sup> Esta equivalência tem ganho aceitação e está sendo usada em tabelas de composição de alimentos (TEE; 1992).

## 2.10 Metodologia analítica

Os recentes artigos sobre os carotenóides provitamínicos têm enfatizado a necessidade de se separar não só pigmentos inativos, como quantificar individualmente os carotenóides ativos e suas formas isoméricas *cis-trans*, procurando evitar a degradação e a formação artificial de isômeros durante os procedimentos analíticos. Deste modo, as metodologias utilizadas para a análise de carotenóides provitamínicos têm sido objeto de muita discussão e as tabelas de composição de alimentos, que trazem a atividade vitamínica A baseada em estudos que não tomaram os cuidados analíticos apresentados, colocados sob suspeita.

As metodologias analíticas para a determinação de carotenóides geralmente apresentam similaridade em várias etapas, como os processos de extração que, na maioria, empregam solventes orgânicos; saponificação, necessária para amostras com elevados teores de lipídeos; separação dos carotenóides, através de técnicas cromatográficas, e quantificação.

### Extração dos pigmentos

Segundo DAVIES (1976), não existe um método de extração que pode ser adotado universalmente como uma técnica padrão. Os procedimentos devem ser adequados para a amostra que se esteja trabalhando. Precauções como o uso de solventes puros (livres de impurezas como peróxidos, ácidos livres, etc.) e proteção contra agentes de degradação como a luz, temperatura e oxigênio têm sido citadas na literatura.

DAVIES (1976) divide os procedimentos de extração por tipos de amostras, como tecidos de plantas, algas e fungos. Para amostras de tecidos de plantas, o autor apresenta dois métodos, separados pela quantidade de amostra a ser analisada.

No primeiro método, utilizado para maiores quantidades de amostra (mais que 0,5 g) e citado como bastante versátil, podendo ser utilizado também para extração dos pigmentos em raízes, flores e frutos, o material é cortado em pequenos pedaços e homogeneizado com acetona por 1 a 2 minutos em triturador apropriado. O extrato é filtrado sob vácuo e o resíduo recuperado para novas extrações. O procedimento é repetido até que todo o pigmento seja extraído. O filtrado é adicionado a igual volume de éter etílico, livre de peróxido, em um funil de separação e a acetona é separada e removida pela adição de água. A fração aquosa é reextraída com éter etílico e o extrato etéreo lavado com água para a remoção da acetona.

No segundo método, indicado para trabalhos com pequenas quantidades de materiais (0,5 g), o tecido é cortado em pequenos pedaços e, após misturado com sulfato de sódio anidro, transformado em pó. Este pó é extraído com acetona (ou com acetona seguida de éter etílico). O extrato é filtrado a vácuo e o resíduo recuperado para novas extrações, repetindo os procedimentos do primeiro método.

Em ambos os métodos, os passos seguintes dependem da quantidade de lipídeos presentes. Se a saponificação não for necessária, o extrato, desidratado com o auxílio de sulfato de sódio anidro, é concentrado em evaporador rotatório a vácuo e encaminhado para passos posteriores de separação.

Para amostras de algas e fungos, o autor sugere a inclusão de mecanismo de ruptura, para tornar a extração mais eficiente, e a utilização de solventes mais polares que a acetona, como uma mistura da própria acetona com metanol ou a utilização de etanol ou metanol puros. Uma vantagem da utilização dos álcoois é a possibilidade da saponificação direta do extrato inicial. O autor apresenta ainda um método para a extração de pigmentos de algas, denominado "autocromatografia" onde o extrato de algas é seco, triturado e transferido para

uma coluna de cromatografia, onde os pigmentos são eluídos com misturas de benzeno e metanol.

COST 91<sup>21</sup>, também separa as análises de carotenóides de acordo com o material a ser analisado. Os métodos são divididos em: determinação de carotenoides totais em alimentos complexos; de carotenóides naturais em vegetais e de carotenóides totais em bebidas (BRUBACHER *et al.*, 1985).

As amostras de alimentos complexos são saponificadas diretamente com uma solução de etanol, hidróxido de potássio, éter de petróleo (30-60°C) e hidroquinona por 30 minutos a 60°C. Uma alíquota da fase etérea é lavada com água para a remoção do álcali, concentrada e submetida a cromatografia.

No procedimento para determinar carotenóides em vegetais, o material de plantas secas é deixado em repouso durante uma noite com uma mistura de acetona e hexano e saponificado a seguir, enquanto que o material de plantas frescas é extraído com acetona e encaminhado à saponificação.

Os carotenóides de bebidas são extraídos por agitação com clorofórmio; a emulsão formada é centrifugada e, após a remoção da fase aquosa, o extrato é encaminhado para a cromatografia.

A Association of Official Analytical Chemists (WILLIAMS, 1984) apresenta um método baseado na extração dos pigmentos com uma mistura de acetona, hexano, etanol e tolueno (7:10:6:7). Este método tem sido bastante criticado por ocasionar a extração incompleta dos pigmentos (SIMPSON, 1983).

TAYLOR (1983) descreve, entre outros, uma metodologia para a extração de carotenóides e retinóides em tecidos animais onde os pigmentos podem ser extraídos de sangue ou plasma, diretamente com hexano ou éter etílico após a

---

<sup>21</sup> European Cooperation in Scientific and Technological Research.

precipitação das proteínas com álcool. Outros tecidos como fígado e rins são necessariamente saponificados antes da extração.

### **Saponificação dos extratos**

A saponificação utilizada na determinação de carotenóides tem sido justificada pela necessidade de se remover o material lipídico que possa interferir na separação cromatográfica, separação de materiais fotossintéticos como a clorofila e para a saponificação dos ésteres de xantofilas presentes.

Basicamente dois processos de saponificação têm sido usados nas análises de carotenóides. Um dos procedimentos envolve o aquecimento da mistura alcalina, em atmosfera inerte (sob fluxo de nitrogênio), por períodos de tempo que variam de 5 a 30 minutos. No outro processo, a mistura alcalina é deixada à temperatura ambiente por períodos que variam de 12 a 16 horas.

QUACKENBUSH (1973) apresentou um estudo colaborativo com vinte laboratórios, procurando comparar processos de saponificação à temperatura ambiente por uma noite (12 horas) e por aquecimento a 56°C por vinte minutos. Os resultados indicaram não haver diferenças significativas entre ambos os procedimentos.

Contudo, KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), avaliando seis procedimentos comuns de saponificação, indicaram a diminuição e formação de artefatos (como *cis*-isômeros e epoxicarotenóides) quando são empregadas condições com elevadas temperaturas e concentrações de hidróxido de potássio. Ainda, segundo as autoras, a degradação dos carotenóides pode ser reduzida pela condução da saponificação a frio, sob nitrogênio ou com pirogalol.

Após os processos de saponificação citados, o álcali presente é eliminado através da lavagem do extrato com água e secagem com sulfato de sódio anidro.

Os pigmentos resultantes na mistura são separados por processos cromatográficos.

### **Separação cromatográfica**

Quase todas as técnicas cromatográficas têm sido citadas nos estudos dos carotenóides. Algumas são pouco utilizadas, como a cromatografia em papel, que pode permitir a degradação e isomerização dos pigmentos durante a separação, e a cromatografia gás-líquido, que tem seu uso limitado pela termolabilidade da cadeia poliênica comum nos carotenóides. Contudo, a cromatografia gás-líquido, em combinação com a espectrometria de massas, tem sido usada para a identificação destes pigmentos (TAYLOR, 1983). Outras técnicas, como a cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna aberta (clássica - CCA) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), têm sido extensivamente utilizadas nos estudos dos carotenóides.

A simplicidade da cromatografia em camada delgada tem feito desta técnica um dos métodos mais utilizados na separação dos carotenóides e particularmente útil no acompanhamento das reações e no "screening" de amostras desconhecidas. TAYLOR (1983) apresenta uma revisão sobre as fases móveis e estacionárias e exemplos de separação de carotenóides, utilizando esta técnica.

A utilização da CCA por métodos oficiais como na metodologia recomendada pela Association of Official Analytical Chemists (WILLIAMS, 1984), no método recomendado por COST 91 (BRUBACHER *et al.*, 1985) e na separação individual de carotenóides revista por RODRIGUEZ *et al.* (1976), tem feito desta técnica o método de separação mais utilizado na determinação de carotenóides provitamínicos. Numerosas combinações de fases estacionária e solventes utilizados na cromatografia em coluna aberta para o estudo destes pigmentos são apresentadas por DAVIES (1976), TAYLOR (1983) e SIMPSON *et al.* (1985). A separação dos isômeros geométricos de carotenóides provitamínicos

por CCA é descrita por BICKOFF *et al.* (1949), SWEENEY e MARSH (1970 e 1971 a, b), GEBHARDT *et al.* (1977), OGUNLESI e LEE (1979), EDWARDS e LEE (1986), LEE *et al.* (1981 e 1984) e LEE (1986).

Atualmente a CLAE tem sido extensivamente utilizada na análise dos carotenóides, principalmente pela rapidez, precisão e reprodutividade a ela atribuída. CARVALHO *et al.* (1992), compararam a utilização da CLAE com a cromatografia em coluna aberta para a determinação de carotenóides provitamínicos. Segundo os autores, ambas as metodologias são eficientes neste tipo de estudo e que a CLAE apresenta como problema a ausência de padrões analíticos confiáveis. Ainda segundo os autores, a CCA pode ser um eficiente mecanismo para auxiliar a CLAE na preparação e identificação dos pigmentos utilizados como padrões.

Outra dificuldade observada em artigos que utilizam a CLAE encontra-se a etapa de preparação da amostra destinada à separação cromatográfica. Métodos rápidos, como os descritos por BUSHWAY e WILSON (1982), HSIEH e KAREL (1983) e BUREAU e BUSHWAY (1986), comprometem os processos cromatográficos devido ao grande número de impurezas co-extraídas. Outros processos, como o apresentado por ZACARIA *et al.* (1979), demoram dois dias na preparação da amostra.

Várias fases estacionárias têm sido utilizadas na separação de carotenóides, como a alumina, descrito por REEDER e PARK (1975) e VECCHI *et al.* (1981); hidróxido de cálcio (TSUKIDA *et al.*, 1982; CHANDLER e SCHWARTZ, 1987 e 1988); óxido de magnésio (VECCHI *et al.*, 1981); nitrila (GILLAN e JOHNS, 1983) e sílica (HAJIBRAHIM *et al.*, 1978) que, apesar de eficiente, pode apresentar a degradação dos carotenóides durante a separação (BRAUMAN e GRIMME, 1981). As colunas de fase reversa (C<sub>18</sub>) são as mais utilizadas, aparecendo na maioria dos trabalhos desta área (RÜEDI, 1985; GREGORY *et al.*, 1987; BUSHWAY e WILSON, 1982; KHACHIK *et al.*, 1986, 1988, 1989 e 1992;

HEINONEN *et al.*, 1989; GRANADO *et al.*, 1992; SCOTT, 1992 e SCOTT e HART, 1993).

### **Identificação e quantificação**

A identificação e a quantificação dos pigmentos separados completa o quadro de dificuldades apresentadas nesta área analítica. O grande número de estruturas de carotenóides existentes e a dificuldade de se obter padrões comerciais da maioria destes pigmentos, torna necessária a utilização de procedimentos complementares que viabilizem estes processos.

Assim, os pigmentos são identificados pelo tempo de retenção e através do espectro de absorção, parâmetros utilizados por um grande número de trabalhos para a identificação destes pigmentos (DAOOD *et al.*, 1987 e 1989; BIACS *et al.*, 1989; HEINONEN *et al.*, 1989; TAYLOR e McDOWELL, 1991; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1992; GRANADO *et al.*, 1992) e, em muitos casos, complementados por reações químicas específicas ou mesmo com o auxílio da espectrometria de massas (MERCADANTE, 1994).

A quantificação, dificultada pela ausência de padrões analíticos confiáveis (QUACKENBUSH e SMALLIDGE, 1986) e pela instabilidade destes pigmentos, torna necessário a busca de alternativas como a obtenção destes padrões a partir de fontes naturais ou mesmo a utilização de substância artificiais como padrão interno (QUACKENBUSH e SMALLIDGE, 1986; CARVALHO *et al.*, 1992).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Matéria-prima

A escolha de amostras como laranja (*Citrus sinensis*, Osbeck), moranga (*Curcubita maxima*), azeite de dendê<sup>22</sup> (comercial) e pêssego (*Prunus persica*) foi devido à composição complexa de carotenóides presentes, levando em consideração a possível presença dos isômeros geométricos de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina. As amostras de laranja, moranga e azeite de dendê foram adquiridas junto a supermercados de Campinas - SP; as de pêssego foram colhidas na fazenda Experimental de Jundiaí, pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas.

A laranja escolhida foi da variedade Pêra, a moranga da variedade Exposição, o pêssego da variedade Rei da Conserva e o azeite de dendê de uma marca comercializada em embalagens de vidro de 200 mL.

#### 3.2 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian, modelo 5000, munido de injetor marca Rheodyne, modelo 7125, com *loop* de 10  $\mu$ L e forno para aquecimento de coluna; detector UV/visível, marca Varian, modelo UV100, ligado a um integrador/registrator, marca Varian, modelo 4290 e detector de arranjo de diodos (DAD), marca Shimadzu, modelo SPDM6A, ligado a um microcomputador marca Acer, modelo 915V.

- Espectrofotômetro UV/visível, marca VAN-DEN, modelo DC 2500 com duplo feixe e cubetas de 1cm de percurso óptico, ligado a um registrator potenciométrico marca Intralab, modelo Ômega.

- Espectrofotômetro UV/visível, marca Hitachi, modelo U2000, com "auto sipper" e amostrador automático, marca Hitachi, modelo AS1000.

---

<sup>22</sup> Óleo obtido da polpa do fruto da palmeira *Elaeis guineensis*, Jacq. ou da palmeira *E. oleifera*. Conhecido como óleo de palma, e no Brasil, como azeite ou óleo de dendê.

- Evaporador rotativo, marca Tecnal, modelo TE 120.
- Sistema de filtração "Sep-pak cartridge rack", marca Millipore.
- Sistema de refrigeração, marca Huber, modelo TC30E, com banho termostaticado.

### **3.3 Vidraria**

Toda a vidraria utilizada foi de cor âmbar ou envolvido com papel alumínio para proteger os pigmentos da luz difusa.

### **3.4 Reagentes**

Os reagentes e solventes utilizados foram grau "para análise" ou "para cromatografia" de acordo com sua finalidade.

### **3.5 Colunas cromatográficas**

Três colunas comerciais e duas colunas recheadas nos nossos laboratórios foram avaliadas:

- Coluna LiChroCART de 125 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, com fase estacionária LiChrospher 100, RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , marca E. Merck (artigo 50823, lote nº 611956), equipada com pré-coluna RP-18, marca E. Merck (artigo 50803).

- Coluna LiChroCART de 125 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, com fase estacionária LiChrospher 100  $\text{NH}_2$ , 5  $\mu\text{m}$ , marca E. Merck (artigo 50824, lote nº 707172), equipada com pré-coluna  $\text{NH}_2$ , marca E. Merck (artigo 50804).

- Coluna com fase estacionária Micropack CN, 10  $\mu\text{m}$ , de 250 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, marca Varian.

- Coluna de 250 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, recheada nos laboratórios do Instituto de Tecnologia de Alimentos, com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , marca Nakarri Chemicals.

- Coluna de 150 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, recheada, nos laboratórios do Instituto de Química da UNICAMP, com LiChrosorb Alox-T, 5  $\mu\text{m}$ , marca Merck.

### 3.6 Padrões analíticos

Com a dificuldade de se encontrar no mercado padrões analíticos confiáveis que possam ser usados nos trabalhos de CLAE, os carotenóides utilizados como padrões analíticos neste trabalho, provenientes de fontes comerciais ( $\beta$ -caroteno) ou extraídos de vegetais, foram purificados no laboratório através de cromatografia em coluna aberta, identificados e quantificados conforme descrito por RODRIGUEZ *et al.* (1976) e por DAVIES (1976).

A isomerização foi realizada com a adição de duas gotas de uma solução etérea de iodo (1-2% em relação ao peso do pigmento) a uma solução etérea de carotenóides (com concentração entre 0,1-1,0 mg/mL) e exposição à luz por cinco minutos, segundo DAVIES (1976). A configuração *trans* apresenta um deslocamento batocrômico em seu espectro, em relação ao espectro na forma *cis*, e a configuração *cis* um deslocamento hipsocrômico. A fim de evitar reações irreversíveis, o iodo foi removido, enxaguando a solução de pigmentos com uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a 2% (m/v), seguida de lavagem com água e secagem com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Rearranjos *cis-trans* não são reações exclusivas da exposição do iodo com os carotenóides; o iodo participa também de reações laterais irreversíveis se os pigmentos forem deixados a uma exposição prolongada à luz ou se a sua concentração for alta em relação aos pigmentos (DAVIES, 1976).

Para a identificação do tempo de retenção de cada isômero geométrico, o extrato isomerizado foi fracionado por cromatografia em coluna aberta, utilizando hidróxido de cálcio como fase estacionária e soluções com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (30 - 60°C) como eluente. As

frações separadas foram concentradas, identificadas e injetadas no cromatógrafo (Figura 36).

### **3.7 Métodos**

O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa procurou-se avaliar a eficiência de várias fases estacionárias na separação dos isômeros geométricos de carotenóides provitamínicos. Na segunda etapa utilizaram-se as melhores condições encontradas na primeira, para o estudo de algumas amostras que têm se apresentado como problema para as técnicas analíticas tradicionais, quanto à separação adequada dos isômeros geométricos.

#### **3.7.1 Sistemas cromatográficos estudados (I Etapa)**

Foi estudada a eficiência de cinco tipos de fases cromatográficas na separação de isômeros geométricos de carotenóides provitamina A: LiChrospher 100 RP-18; LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>; Micropak CN; Ca(OH)<sub>2</sub> e LiChrosorb Alox-T. Como fases móveis foram estudadas sistemas isocráticos e gradientes com diversos solventes como: metanol, acetona, clorofórmio, acetonitrila, n-hexano, diclorometano, iso-octano e água.

Os testes foram conduzidos com o detector UV/visível no comprimento de onda de 470nm e atenuação de 0,02 AU/mV.

Tendo em vista o trabalho de ST. LOUIS e WILDER (1981), onde foi utilizado o resfriamento de colunas cromatográficas para a separação de estereoisômeros de ciclohexanodimetanoldibenzoato, procuramos também estudar o efeito da alteração da temperatura da coluna na separação dos isômeros geométricos de β-caroteno nas colunas C<sub>18</sub> e Ca(OH)<sub>2</sub>. Para isso foi utilizado o forno do cromatógrafo para o trabalho com as colunas acima da temperatura ambiente (27°C) e instalado um sistema de refrigeração para trabalhos em temperaturas inferiores à ambiente.

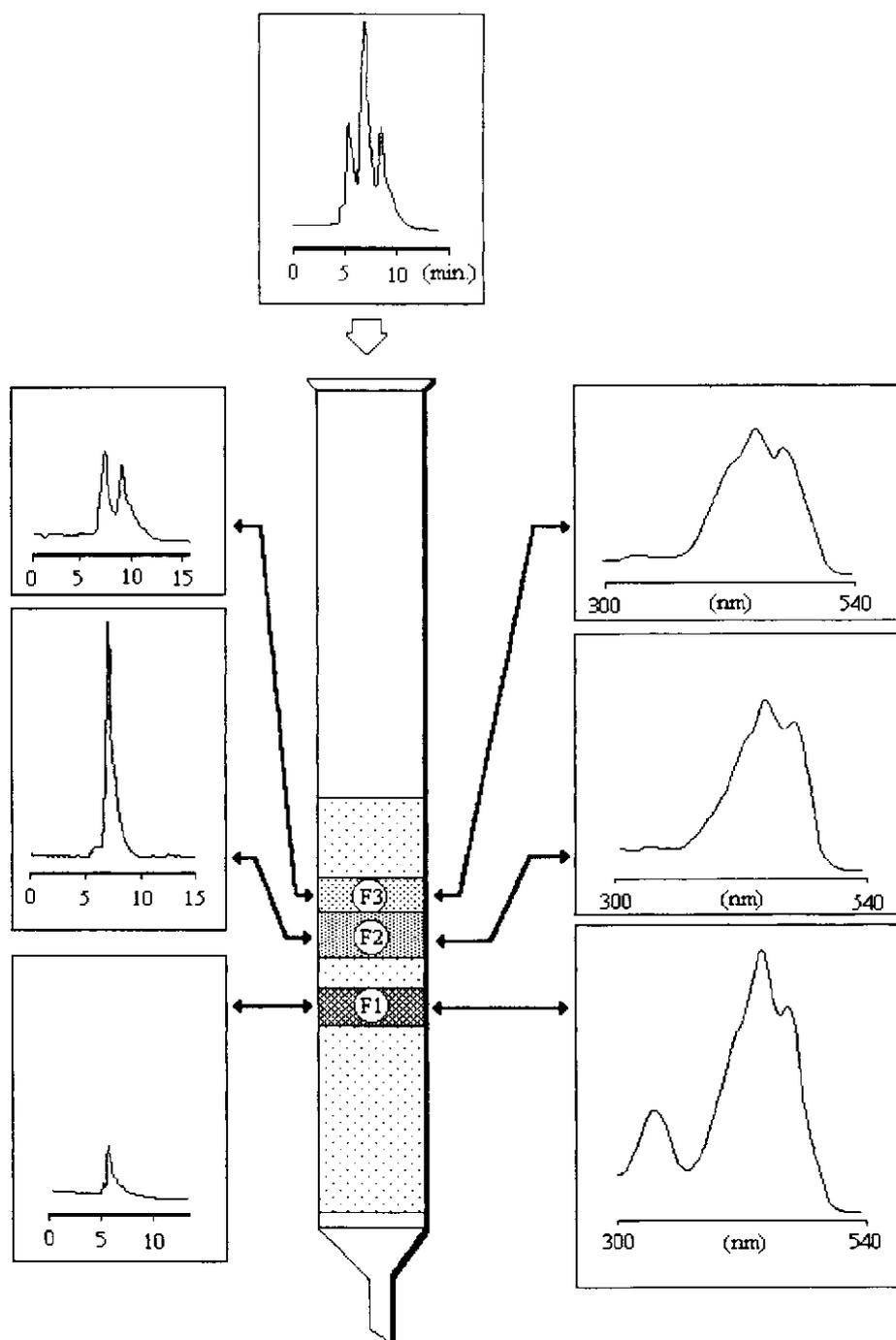


FIGURA 36 - Separação e identificação de isômeros geométricos de  $\beta$ -caroteno por cromatografia em coluna aberta, com hidróxido de cálcio como fase estacionária e soluções com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (30 - 60°C). F1 = 13-*cis*- $\beta$ -caroteno; F2 = *trans*- $\beta$ -caroteno; F3 = *trans*- $\beta$ -caroteno + 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. A separação por CLAE foi realizada em coluna de hidróxido de cálcio com fase móvel de n-hexano em sistema isocrático a uma vazão de 0,5 mL/min.

### 3.7.2 Análise de carotenóides em amostras de alimentos, utilizando coluna de hidróxido de cálcio (II Etapa)

#### Extração dos pigmentos

As amostras, cortadas em pequenos pedaços quando necessário, foram pesadas (5 g para as amostras de azeite de dendê, 50 g para as amostras de pêsego ou de moranga ou 100 g para a amostra de laranja) e transferidas para um *Waring Blendor*. Foram adicionados 100,0 mL de acetona (resfriada a 10 °C), cerca de 10g de "HyfloSupercel" e a mistura triturada durante 2 minutos. O extrato foi filtrado em funil de Büchner e o procedimento foi repetido com o resíduo da filtração até a completa extração dos pigmentos.

#### Clarificação do extrato

O filtrado foi transferido para 100,0 mL de éter de petróleo (30 - 60°C), em funil de separação, em pequenas alíquotas, adicionando água destilada para a separação das fases. A fase aquosa foi descartada. Ao completar essa operação, com todos os pigmentos transferidos para o extrato etéreo, este foi lavado por quatro vezes com água e seco pela passagem através de uma coluna contendo sulfato de sódio anidro.

A amostra foi saponificada com adição de igual volume de uma solução metanólica de hidróxido de potássio 10% (m/v) e repouso ao abrigo da luz por uma noite (12 horas) à temperatura ambiente. Em seguida, a solução etérea foi lavada com água (até que a mesma não se apresentasse mais alcalina) e seca pela passagem através de uma coluna de sulfato de sódio anidro.

Em alguns casos, dependendo do tipo de amostra (sem clorofila e mínima quantidade de lipídeos) e do pigmento carotenóide a ser analisado (carotenos, por exemplo), a saponificação não é necessária. Neste trabalho, os extratos foram saponificados para remover interferentes, como a grande quantidade de óleo no dendê e para hidrolisar os ésteres carotenóides, uma vez que a intenção seria a de quantificar o carotenóide hidroxilado,  $\beta$ -criptoxantina, presente nas demais amostras estudadas.

### **Concentração do extrato**

O extrato foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo, em temperaturas inferiores a 35°C ou sob fluxo de nitrogênio até concentração apropriada para a injeção cromatográfica.

### **Condições cromatográficas**

A separação cromatográfica foi realizada na coluna de hidróxido de cálcio, recheada nos laboratórios do Instituto de Tecnologia de Alimentos, utilizando como sistemas de fases móveis: (a) iso-octano ou n-hexano e (b) uma mistura de iso-octano e acetona, sob gradiente, iniciando com 100% de iso-octano e terminando com iso-octano : acetona (80 : 20) em 60 minutos com vazão de 0,5 mL/min. Os testes foram conduzidos com detector de arranjo de diodos numa faixa de leitura de 300 a 600 nm.

### **Identificação e quantificação dos carotenóides provitamínicos**

Curvas de calibração foram contruídas com carotenóides separados em cromatografia em coluna aberta. Para tanto, aplicando as mesmas técnicas para a obtenção de padrões analíticos usados na primeira etapa deste estudo, uma alíquota do extrato concentrado dos pigmentos carotenóides de fontes naturais ou comerciais foi separada em uma coluna de vidro com 400 mm de comprimento por 25 mm de diâmetro interno, recheada com óxido de magnésio e "HyfloSupercel" (1:1) e eluídos com 0,5% de éter etílico em éter de petróleo (30 - 60°C), seguido de concentrações crescentes de éter etílico ou acetona em éter de petróleo. A separação obtida foi função da polaridade da fase móvel. Os pigmentos separados, e positivamente identificados e quantificados, foram utilizados imediatamente como padrões para a construção das curvas de calibração.

Para a identificação dos carotenóides, foram usados como parâmetros a comparação dos espectros de absorção UV/visível, a ordem de eluição na coluna

e, quando necessário, a confirmação através de reações químicas específicas, conforme descrito por DAVIES (1976). A quantificação foi conseguida através da absorbância máxima dos compostos e dos respectivos valores de absorvidade (DAVIES, 1976).

### **Cálculo do valor de vitamina A**

Segundo o *National Academy of Science - National Research Council (NAS - NRC, 1980)*, 1 ER (Equivalente Retinol) corresponde a 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno e 12  $\mu\text{g}$  dos outros carotenóides provitamina A. Assim, para se calcular o valor vitamínico A das amostras analisadas, foi considerado para os pigmentos em questão ( $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) esta correspondência e, em específico, para os isômeros geométricos do  $\beta$ -caroteno (13-*cis* e 9-*cis*) foram consideradas as suas respectivas atividades vitamínicas de acordo com ZECHMEISTER (1962), demonstradas na Tabela 3.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação de diferentes fases estacionárias (I Etapa)

Dada à possibilidade de degradação causada pela sílica durante a separação de carotenóides (BRAUMAN e GRIMME, 1981), devido ao seu caráter ácido (DAVIES, 1976), esta fase estacionária não foi avaliada neste estudo.

Os resultados obtidos para as demais colunas são demonstrados a seguir.

#### 4.1.1 Coluna com grupo funcional octadecil (C<sub>18</sub>)

A separação em coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>) foi estudada com sistemas isocrático de metanol:acetona, metanol:água, metanol:clorofórmio, etanol:acetona e metanol. Como gradiente de fase móvel foram estudadas misturas de metanol e acetona em concentrações e programações variadas.

Com coluna C<sub>18</sub>, os melhores resultados no sistema isocrático foram conseguidos com uma mistura de 90% de metanol e 10% de acetona, com vazão de 1,0 mL /min., obtendo uma separação parcial dos estereoisômeros. No sistema gradiente, a melhor separação foi conseguida com uma eluição por 15 minutos com metanol puro, seguida por concentrações crescentes de acetona até 50% nos 5 minutos seguintes, com uma vazão de 0,7 mL/min. (Figura 37).

Para avaliar o efeito da temperatura na separação de isômeros geométricos por este tipo de fase estacionária, a coluna foi submetida a diferentes temperaturas, entre 50°C a -5°C. As resoluções obtidas com algumas das temperaturas estudadas estão apresentadas na Figura 38.

QUACKENBUSH e SMALLIDGE (1986) estudaram a separação de isômeros geométricos em vinte colunas comerciais de C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>, onde somente três destas

colunas apresentaram alguma separação. Deste modo, a eficiência deste tipo de fase estacionária na separação de estereoisômeros está associada às características individuais destas colunas.

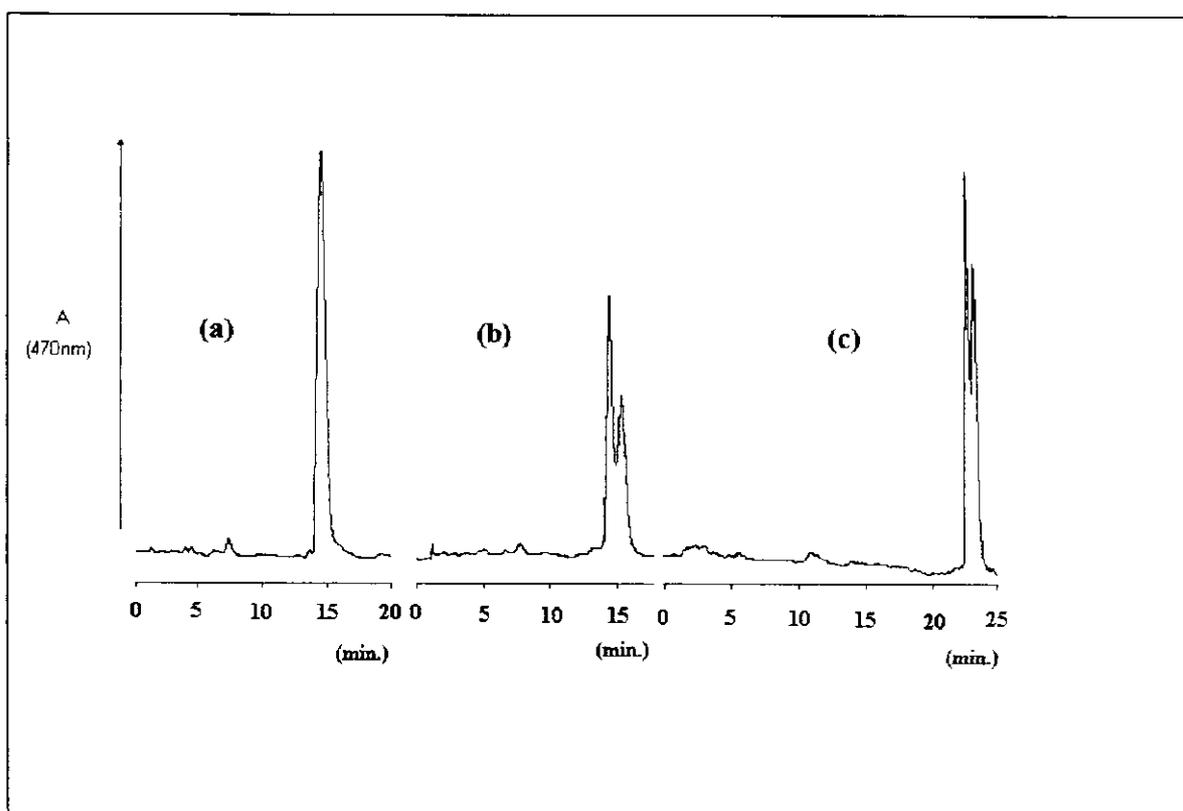


FIGURA 37 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química usando sistema isocrático de eluição; (c) após isomerização química, usando sistema gradiente de eluição. Fase móvel: metanol e acetona. Coluna C<sub>18</sub>. As condições cromatográficas estão descritas no texto.

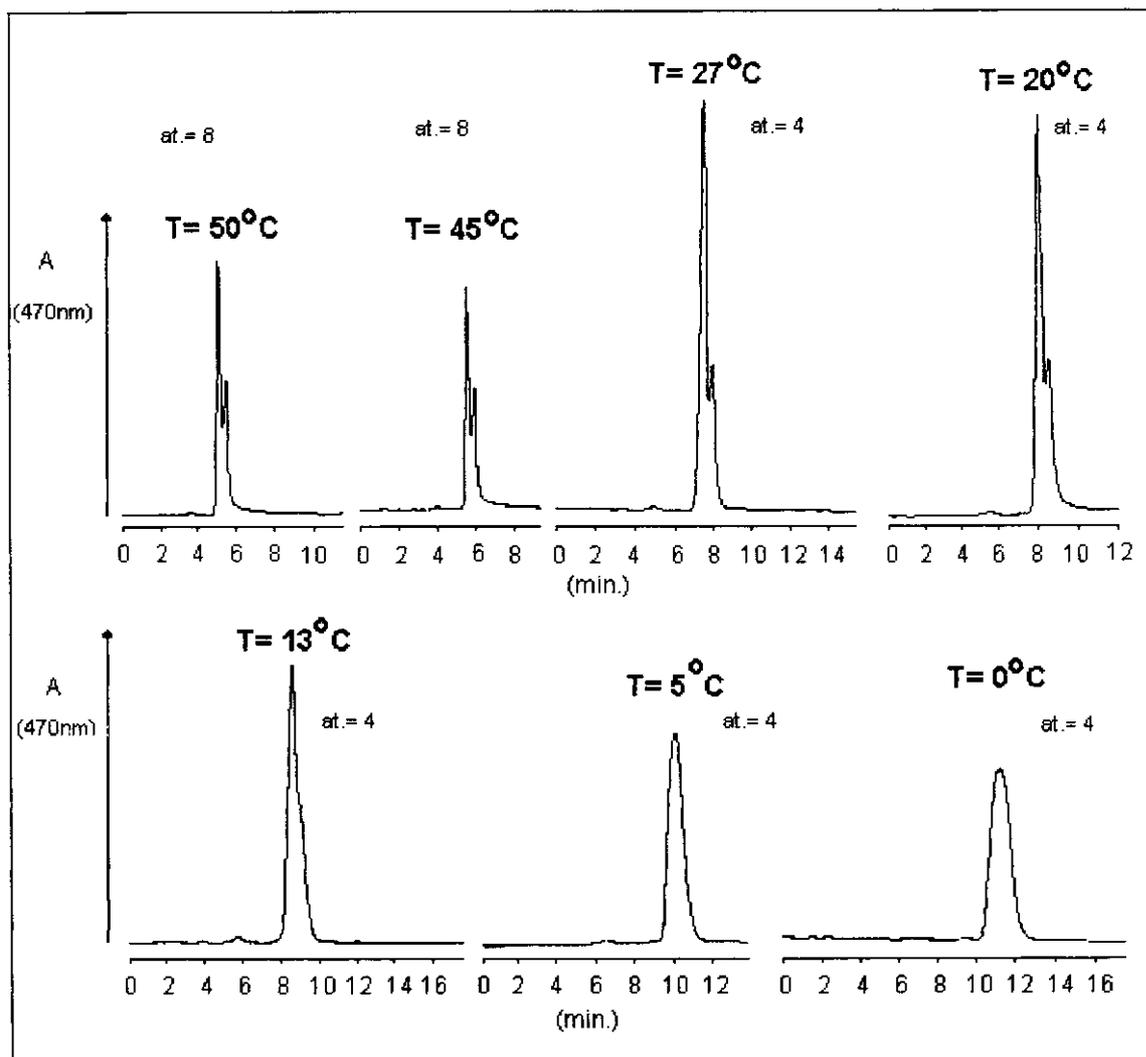


FIGURA 38 - Estudo do efeito da temperatura na resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno. Coluna RP-18 com fase móvel de metanol e acetona (70:30) a uma vazão de 1,0 mL/min. Demais condições descritas no texto. at = atenuação eletrônica.

#### 4.1.2 Coluna com grupo funcional nitrila (CN)

A coluna CN apresentou alguma resolução dos isômeros *cis* e *trans* do  $\beta$ -caroteno quando se utilizou como fase móvel n-hexano com uma vazão de 0,5 mL/min. Porém não foi possível separar as formas *cis* (9-*cis*- $\beta$ -caroteno e 13-*cis*- $\beta$ -

caroteno) (Figura 39). Além de n-hexano, foram também verificadas as eficiências de misturas com concentrações variadas e em operações isocráticas de metanol e diclorometano; n-hexano e diclorometano; n-hexano e acetona; acetonitrila; acetonitrila e acetona e acetona pura, sem obter resolução dos isômeros. Com as fases móveis iso-octano e n-hexano:iso-octano, obtiveram-se separações semelhantes às obtidas apenas com n-hexano.

#### 4.1.3 Coluna com grupo funcional amina (NH<sub>2</sub>)

A coluna de NH<sub>2</sub> não possibilitou a separação de isômeros geométricos quando eluída com 100% de n-hexano ou 100% de iso-octano e misturas em diversas concentrações de acetona em n-hexano e iso-octano em n-hexano. A Figura 40 apresenta os cromatogramas típicos obtidos com a coluna NH<sub>2</sub> utilizada neste estudo.

#### 4.1.4 Coluna de óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

VECCHI *et al.* (1981), separaram 11 isômeros de β-caroteno utilizando uma coluna de óxido de alumínio e fase móvel composta por hexano com teores de água controlados, em um sistema de baixa pressão. O mesmo tipo de fase estacionária foi utilizado por REEDER e PARK (1975) para a análise de carotenóides provitamínicos em suco de laranja, utilizando como fase móvel uma mistura de benzeno e n-hexano (3:5), não indicando a separação de isômeros.

Neste trabalho, a coluna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utilizada não demonstrou eficiência na separação de isômeros geométricos de β-caroteno, utilizando como fases móveis: n-hexano; iso-octano; n-hexano:acetona; n-hexano:iso-octano; n-hexano:diclorometano e diclorometano, em sistemas isocráticos e proporções variadas (Figura 41).

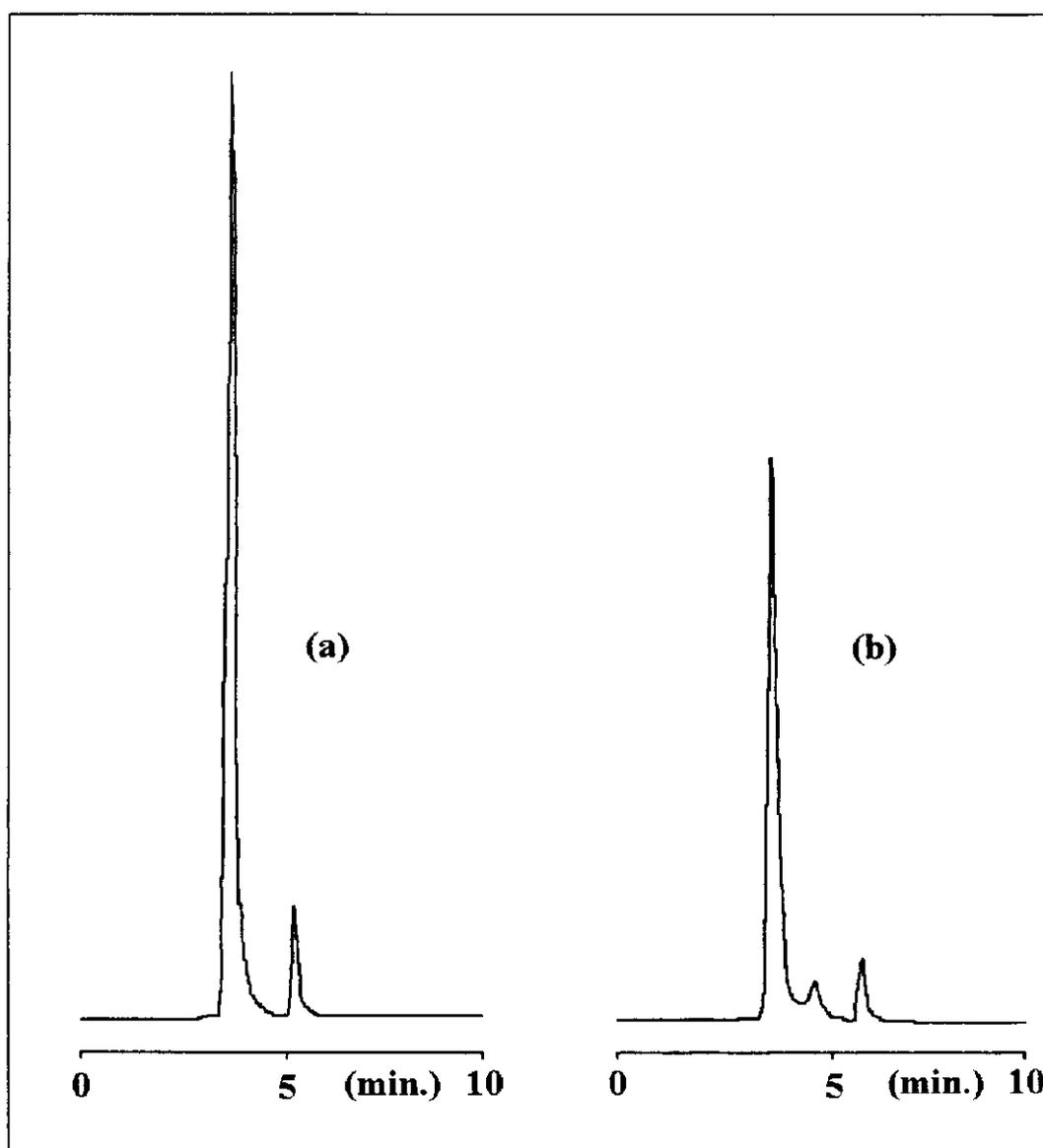


FIGURA 39 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química, usando sistema isocrático de eluição com n-hexano e uma vazão de 0,5 mL/min. Coluna CN.

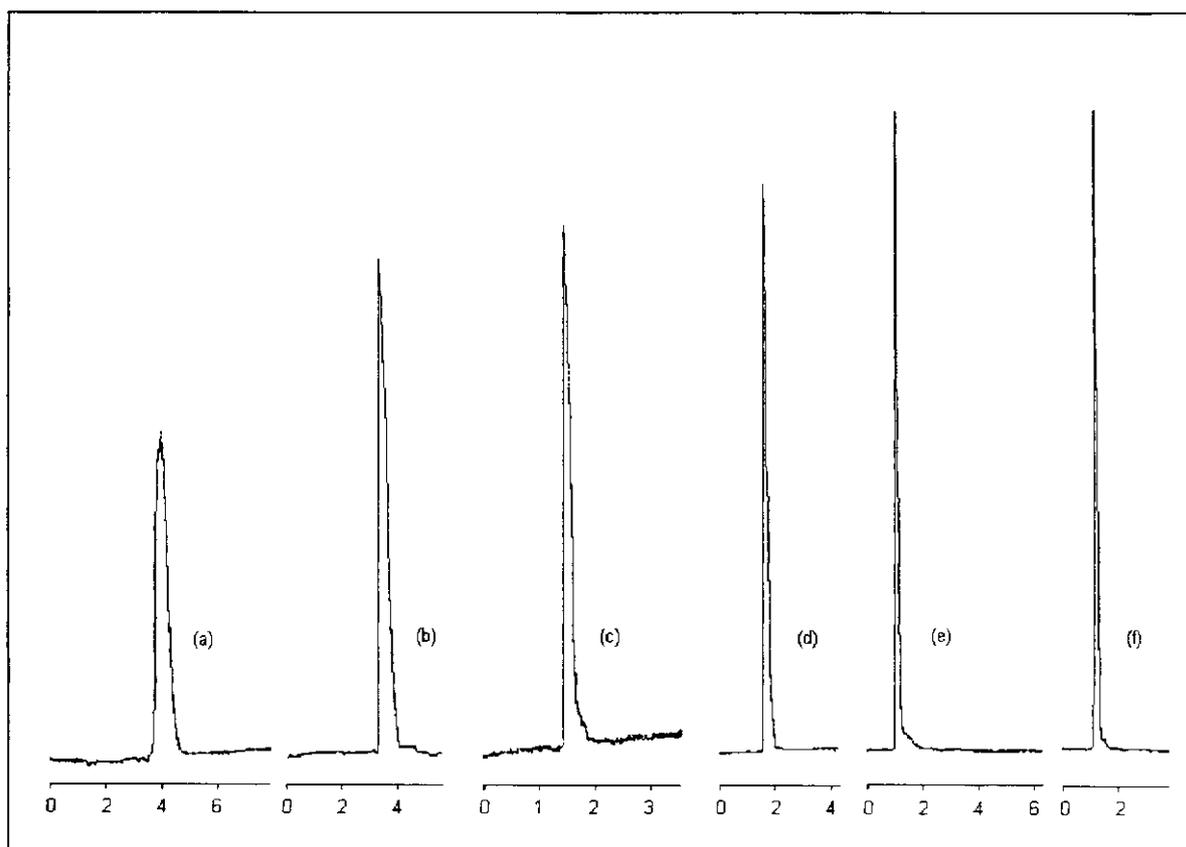


FIGURA 40 - Cromatogramas obtidos com o uso de coluna  $\text{NH}_2$  para separação de isômeros de  $\beta$ -caroteno, com as fases móveis e vazões: (a) iso-octano com uma vazão de 0,5 mL/min.; (b) iso-octano e n-hexano (50:50) com uma vazão de 0,5 mL/min.; (c) n-hexano com uma vazão de 1,0 mL/min.; (d) n-hexano e acetona (80:20) com uma vazão de 1,0 mL/min.; (e) n-hexano e acetona (50:50) com uma vazão de 1,0 mL/min. e (f) n-hexano e acetona (30:70) com uma vazão de 0,5 mL/min. As demais condições estão descritas no texto.

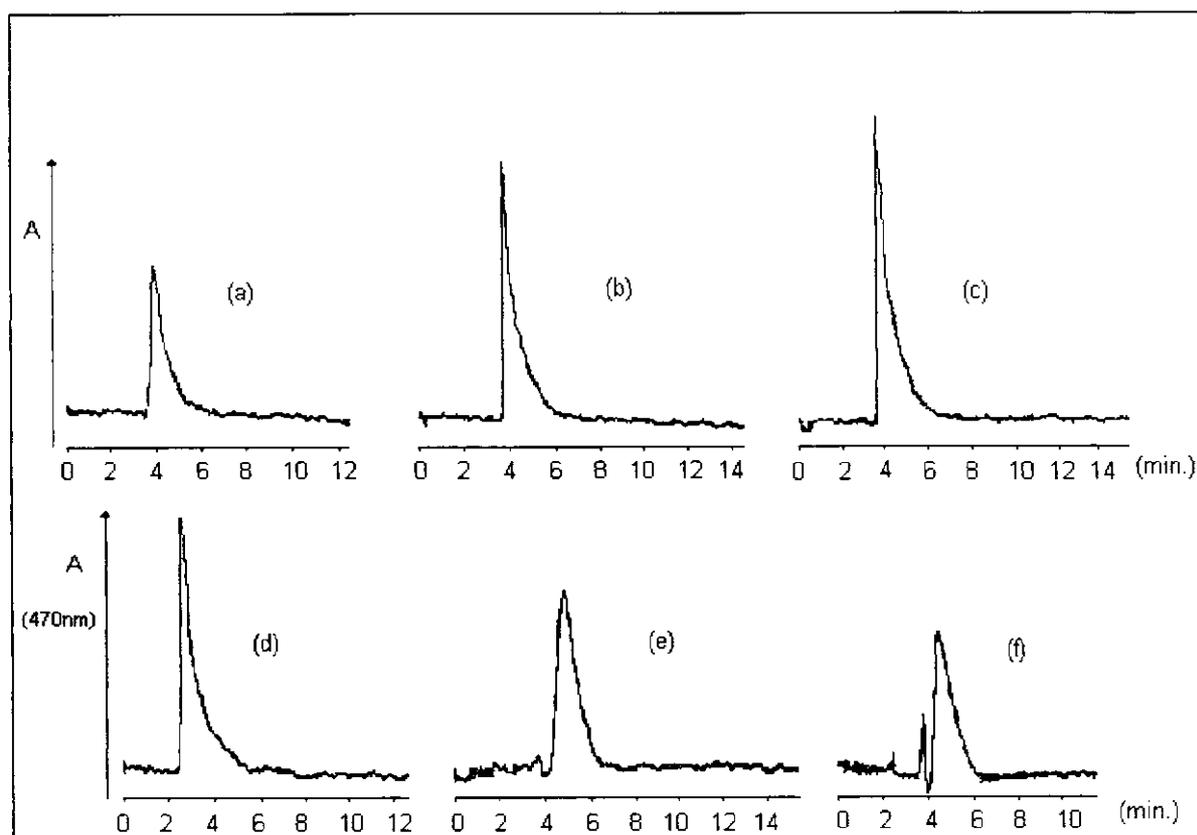


FIGURA 41 - Cromatogramas (CLAE) de uma solução de  $\beta$ -caroteno após isomerização, utilizando sistema isocrático de eluição a uma vazão de 0,5 mL/min. de: (a) n-hexano; (b) n-hexano e diclorometano (50:50); (c) n-hexano e diclorometano (20:80); (d) diclorometano; (e) n-hexano e iso-octano (95:5) e (f) iso-octano. Coluna de óxido de alumínio.

#### 4.1.5 Coluna de hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>)

A coluna de Ca(OH)<sub>2</sub> resultou em melhor resolução dos isômeros de β-caroteno que as demais colunas. Esta resolução foi obtida com a utilização de sistemas isocráticos com fases móveis de n-hexano e de iso-octano (Figura 42) a uma vazão de 0,5 mL/min. Também foram utilizadas misturas de iso-octano e n-hexano em várias concentrações onde as resoluções dos isômeros geométricos não sofreram grandes variações em relação aos sistemas de solventes puros.

Estes resultados são concordantes com os obtidos por TSUKIDA *et al.* (1982) e por CHANDLER e SCHWARTZ (1987) que separaram isômeros 9-*cis* e 13-*cis* de *trans*-β-caroteno utilizando colunas de hidróxido de cálcio.

A utilização de temperaturas entre -25°C e 40°C não melhorou a resolução dos isômeros geométricos de β-caroteno, em trabalhos com a coluna Ca(OH)<sub>2</sub> utilizada neste estudo (Figura 43).

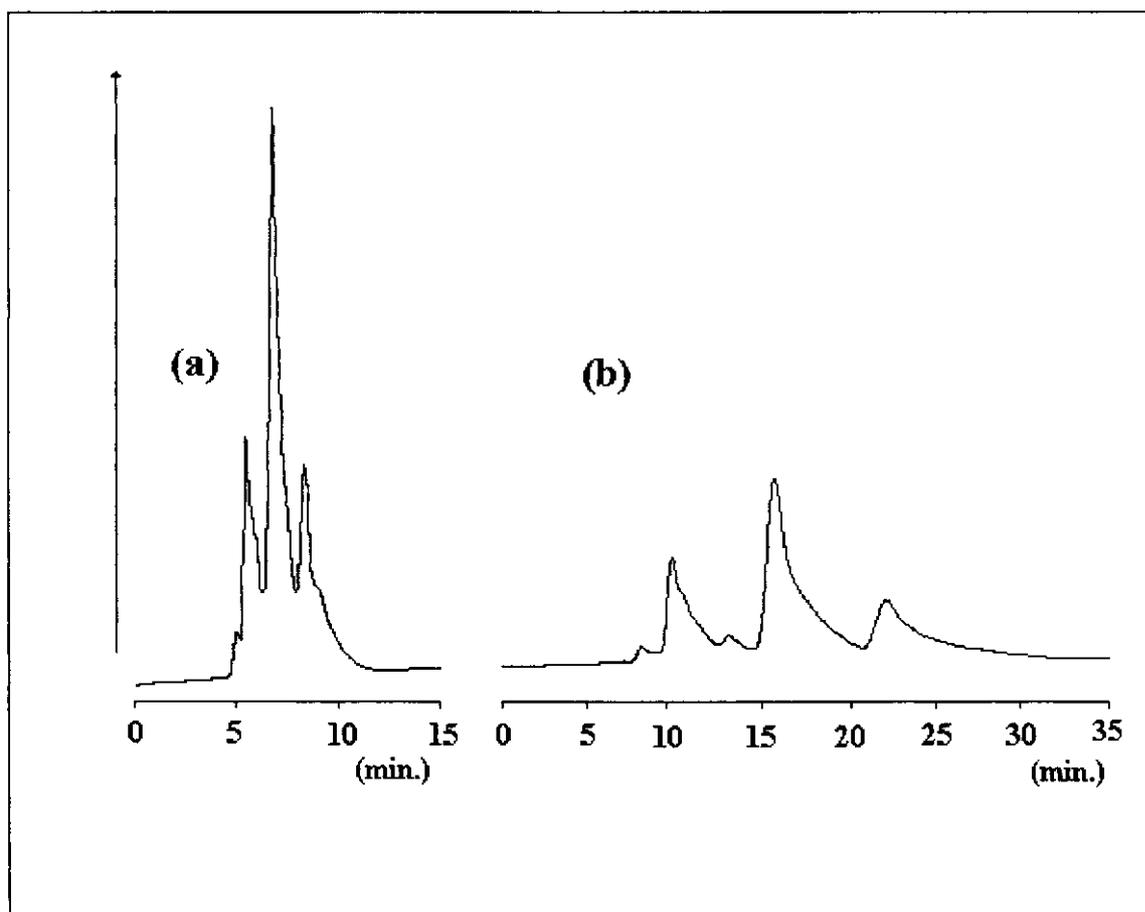


FIGURA 42 - Cromatograma (CLAE) de uma solução de *trans*- $\beta$ -caroteno após isomerização química, usando sistema isocrático de eluição com (a) n-hexano e com (b) iso-octano. Coluna  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . As condições cromatográficas estão descritas no texto.

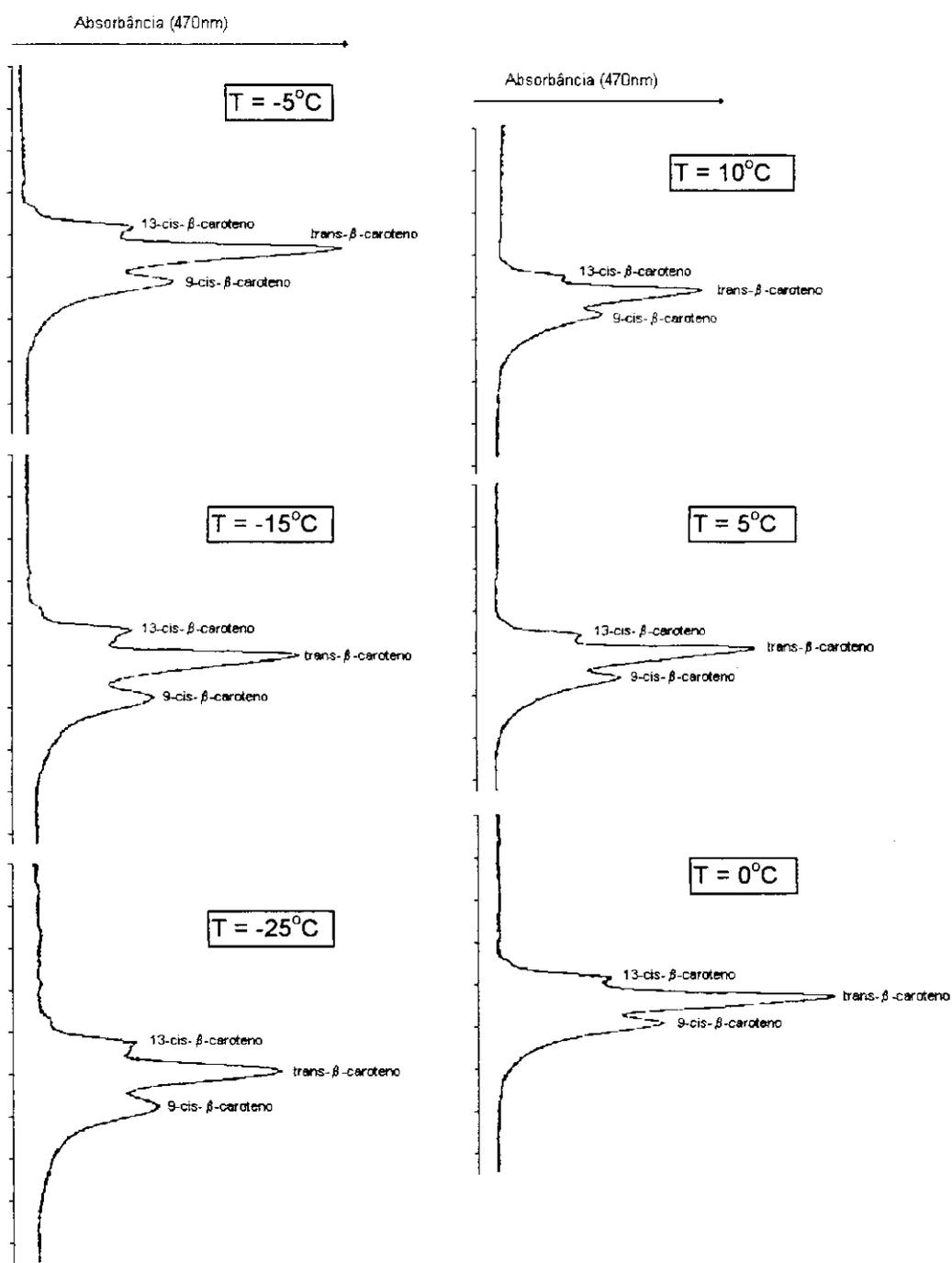


FIGURA 43 - Estudo do efeito da temperatura na resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno. Coluna  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com fase móvel de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min. Demais condições descritas no texto.

## 4.2 Padronização das condições da coluna de hidróxido de cálcio para análise de amostras de alimentos.

Os resultados das avaliações das fases estacionárias para a separação de isômeros geométricos de  $\beta$ -caroteno indicaram a coluna de hidróxido de cálcio como a mais eficiente nos estudos destes nutrientes. Assim, procurou-se estabelecer as condições analíticas necessárias para o trabalho com amostras de alimentos.

Os carotenóides separados por cromatografia em coluna aberta, identificados e quantificados, foram utilizados para o estabelecimento do tempo de retenção e para a construção das curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade da faixa de concentração trabalhada e para a quantificação das amostras estudadas.

As Figuras 44, 45 e 46 apresentam exemplos de curvas de calibração de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, respectivamente. As equações de regressão e os coeficientes encontrados para estas curvas foram:

$\alpha$ -caroteno

$$y = 23,98126 x$$

$$R = 0,999$$

$\beta$ -caroteno

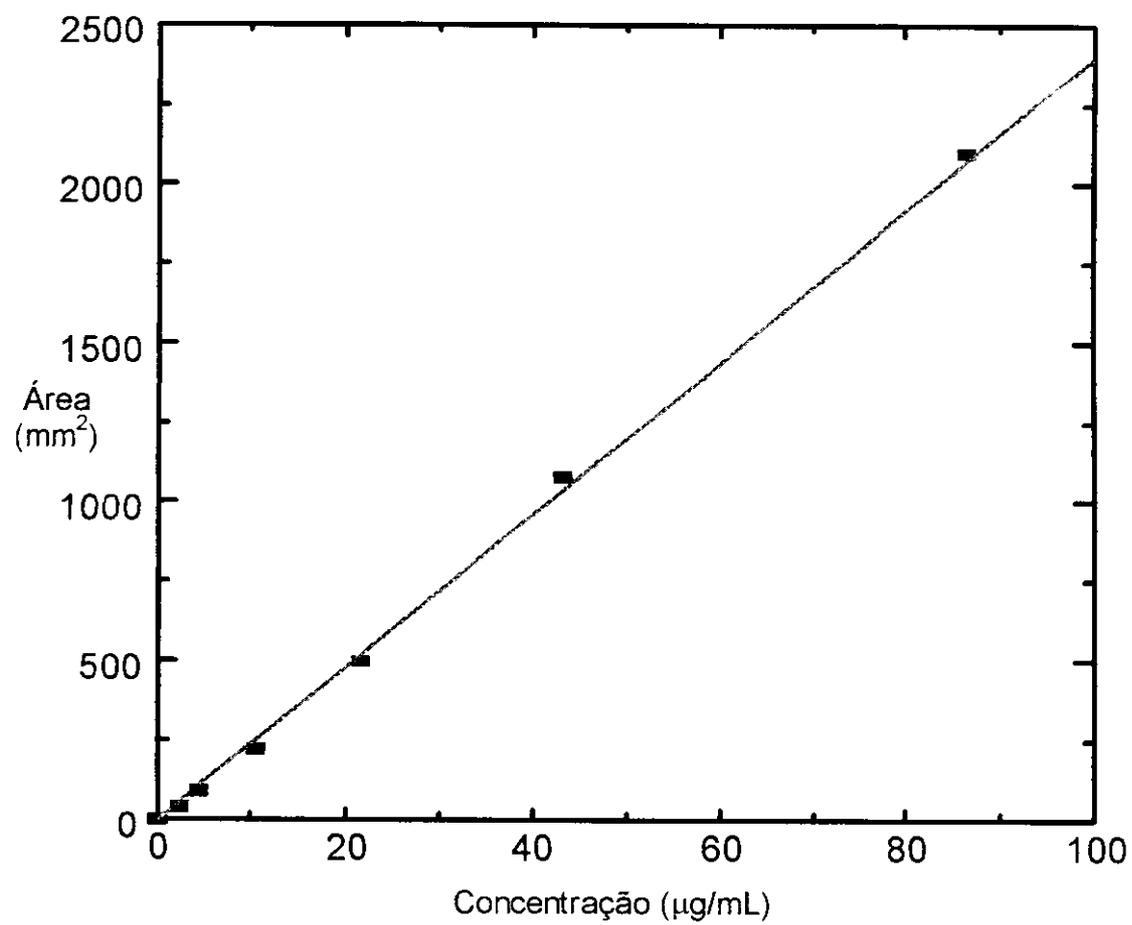
$$y = 18,936 x$$

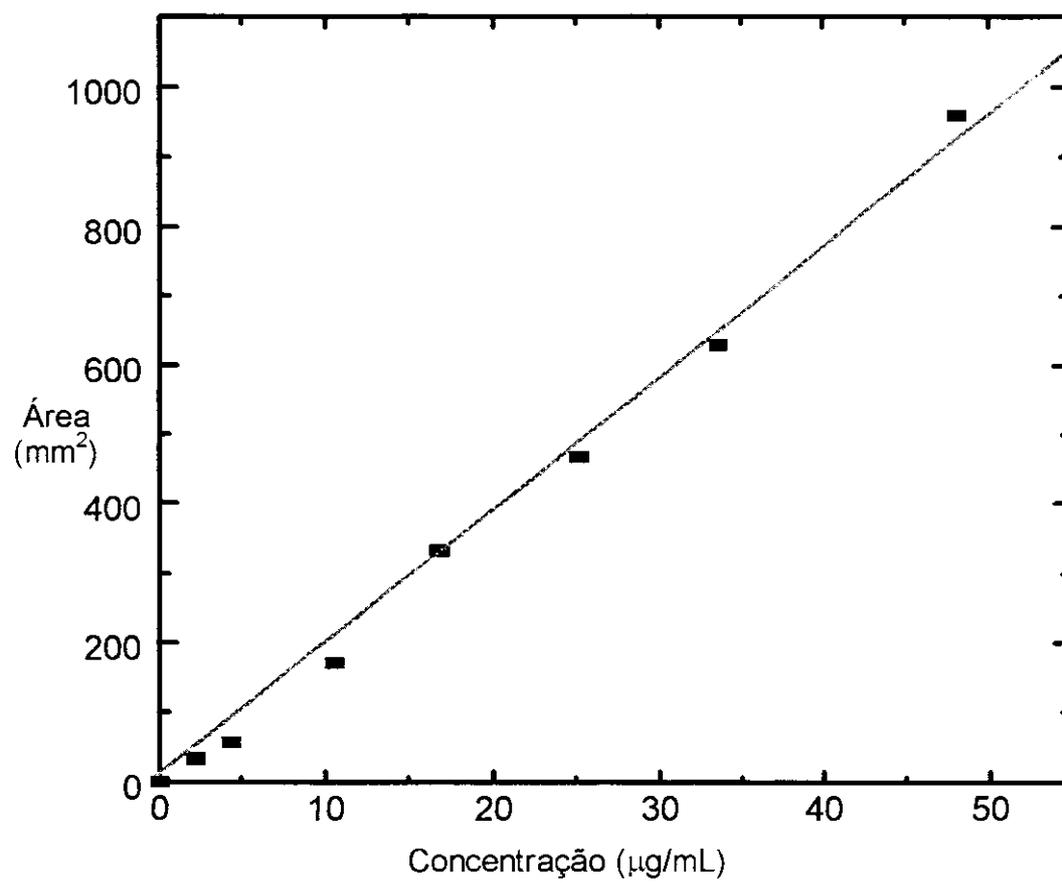
$$R = 0,998$$

$\beta$ -criptoxantina

$$y = 19,279 x$$

$$R = 0,999$$

FIGURA 44 - Curva de calibração de  $\alpha$ -caroteno

FIGURA 45 - Curva de calibração de  $\beta$ -caroteno

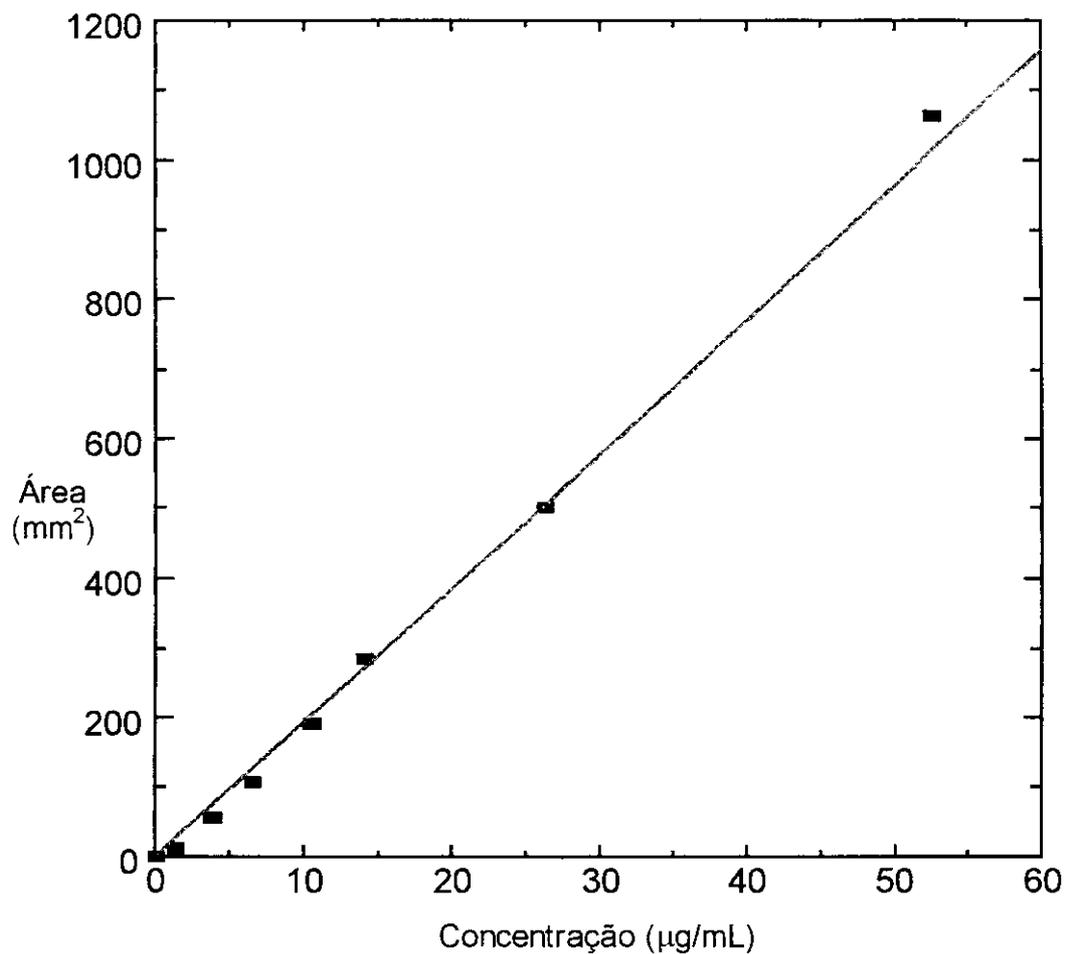


FIGURA 46 - Curva de calibração de  $\beta$ -criptoxantina.

A melhor separação cromatográfica em amostras que continham  $\beta$ -criptoxantina foi conseguida com uma eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. A Figura 47 apresenta os cromatogramas de  $\beta$ -criptoxantina, antes e após isomerização química, utilizando estas condições cromatográficas.

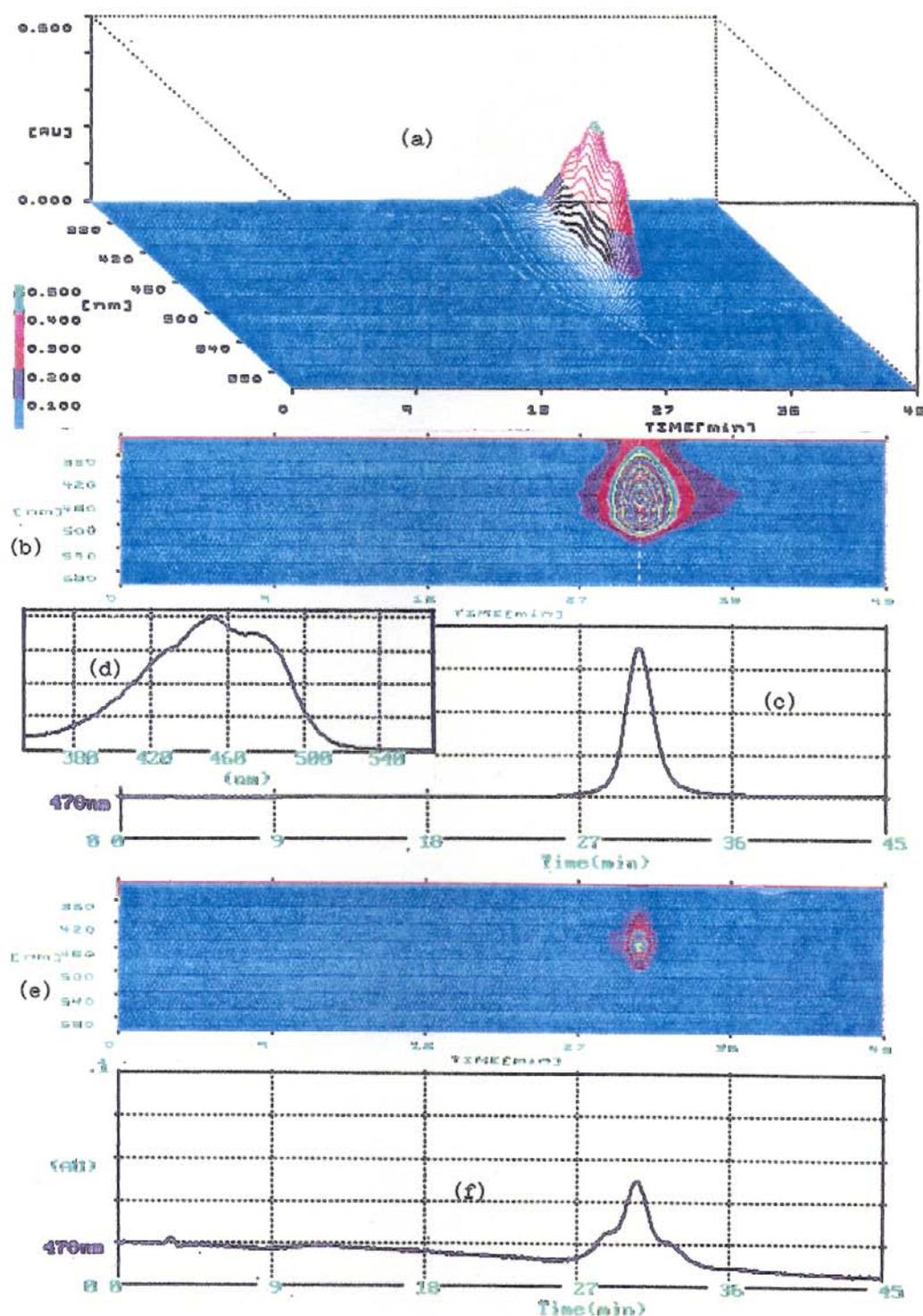


FIGURA 47 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b), bidimensional (c) e espectro de absorção (d) de  $\beta$ -criptoxantina antes de isomerização química e cromatogramas planar (e) e bidimensional (f) após isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), a uma vazão de 0,5 mL/min.

Em amostras com a presença apenas de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, a separação pode ser conseguida com a eluição isocrática de n-hexano ou iso-octano, melhorando, nestes casos, a determinação de possíveis isômeros geométricos presentes. As Figuras 48 e 49 apresentam os cromatogramas de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, separados nestas condições, antes e após isomerização química.

### 4.3 Análise de carotenóides em amostras de alimentos.

Com a finalidade de se conhecer algumas das características químicas e físico-químicas das amostras estudadas e para se ter dados para futuras comparações entre as concentrações dos pigmentos carotenóides, foram realizadas análises de sólidos totais, sólidos solúveis, pH e acidez total, cujos resultados são apresentados na Tabela 5. Dentre as amostras (azeite de dendê, pêsego, laranja e moranga), apenas o azeite de dendê apresentou isômeros de  $\beta$ -caroteno em quantidades apreciáveis e suficientes para a quantificação. O Tabela 6 demonstra os resultados encontrados.

#### Azeite de dendê

TRUJILLO-QUIJANO e colaboradores (1990) estudaram a composição de carotenóides e o valor de vitamina A em óleos de dendê brutos provenientes de quatro tipos de frutos de palmas brasileiras, através da técnica de cromatografia em coluna aberta (CCA), pela qual apresentaram a separação, de forma individual, dos carotenóides presentes, bem como, a resolução dos isômeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno e do licopeno. Os pigmentos identificados foram: *cis*-fitoflueno, 13-*cis*- $\alpha$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, poli-*cis*-licopeno, mono-*cis*-licopeno, bem como outros pigmentos não identificados, nas variedades tenera, dura dumpy e psifera da espécie *Elaeis guineensis*, Jacq., e *cis*-fitoflueno (presente, mas não separado),  $\alpha$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, zeaxantina,  $\beta$ -

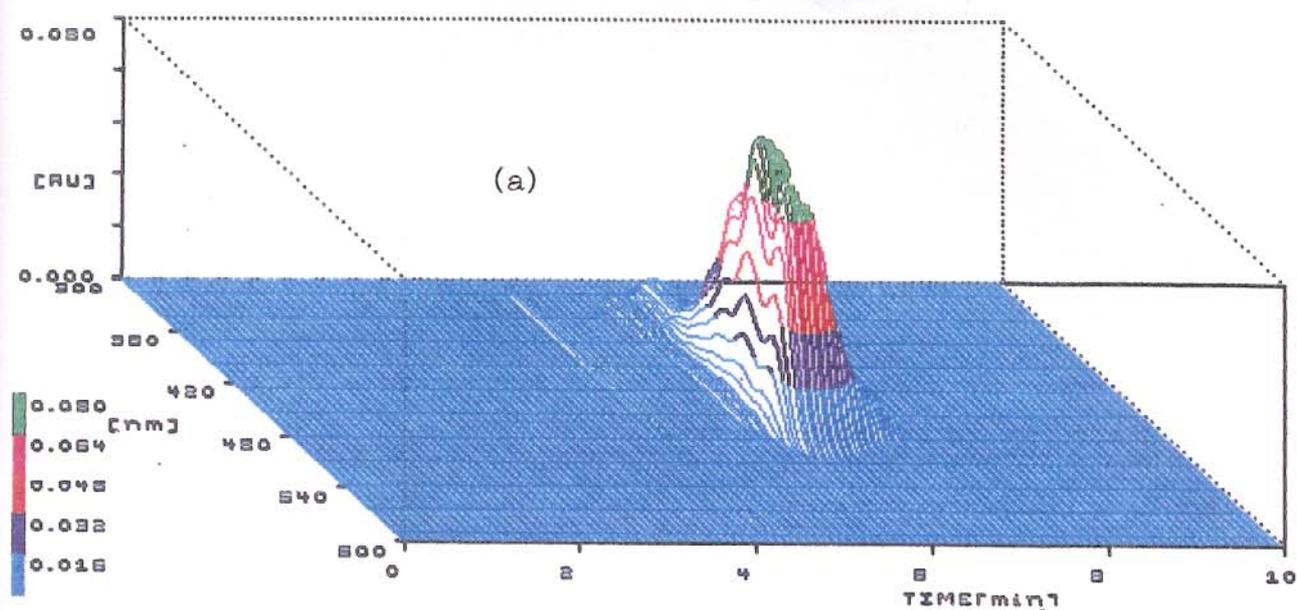
criptoxantina, licopeno e pigmentos não identificados, para a espécie *E. oleífera*. A soma dos teores (em porcentagem) de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno e seus isômeros, em todas as variedades, ultrapassou a 80% e a proporção de  $\alpha$ -caroteno para  $\beta$ -caroteno foi da ordem de 1:2. Dos pigmentos identificados, os que apresentam atividade vitamínica A são  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, incluindo seus isômeros geométricos, e  $\beta$ -criptoxantina. Este último pigmento encontra-se em quantidades traços nas variedades da espécie *E. guineensis*, e a espécie *E. oleífera* apresenta-o em cerca de 2% em relação aos carotenóides totais. Os autores também avaliaram a composição e o valor vitamínico de óleos em que os frutos foram submetidos ao processo de esterilização (uma das etapas da extração do óleo) e verificaram que o procedimento provocou um aumento da concentração dos isômeros geométricos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, com diminuição dos teores de seus respectivos precursores e alterações nas concentrações de certos carotenóides (poli-*cis*-licopeno) na variedade tenera, demonstrando assim, a instabilidade térmica dos carotenóides. Quanto aos valores de vitamina A dos óleos brutos (normal e esterilizado), os resultados indicaram a necessidade de separação dos isômeros para não superestimar os valores vitamínicos.

Sabe-se, entretanto, que dos carotenóides presentes no óleo de dendê comercial, os principais que permanecem após o processo de clarificação<sup>23</sup>, são o  $\alpha$ - e o  $\beta$ -caroteno (em quantidades acima de 90%), apesar da intenção de se eliminar os pigmentos durante a extração para se obter um óleo claro e brilhante, de melhor aceitação (TRUJILLO-QUIJANO, 1988). Esta permanência do  $\alpha$ - e do  $\beta$ -caroteno logicamente se deve ao fato de que o óleo bruto os contém em altas concentrações.

---

<sup>23</sup> Para o processo de clarificação do óleo de dendê é usado o refino físico, onde os pigmentos carotenóides são parcialmente destruídos no pré-tratamento, por adsorção com terras ativadas em temperaturas entre 100-150°C e, "totalmente eliminados" pelo calor durante a desodorização, em temperaturas de 240-270°C (TRUJILLO-QUIJANO, 1988; 1994).

## \*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram



## \*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram

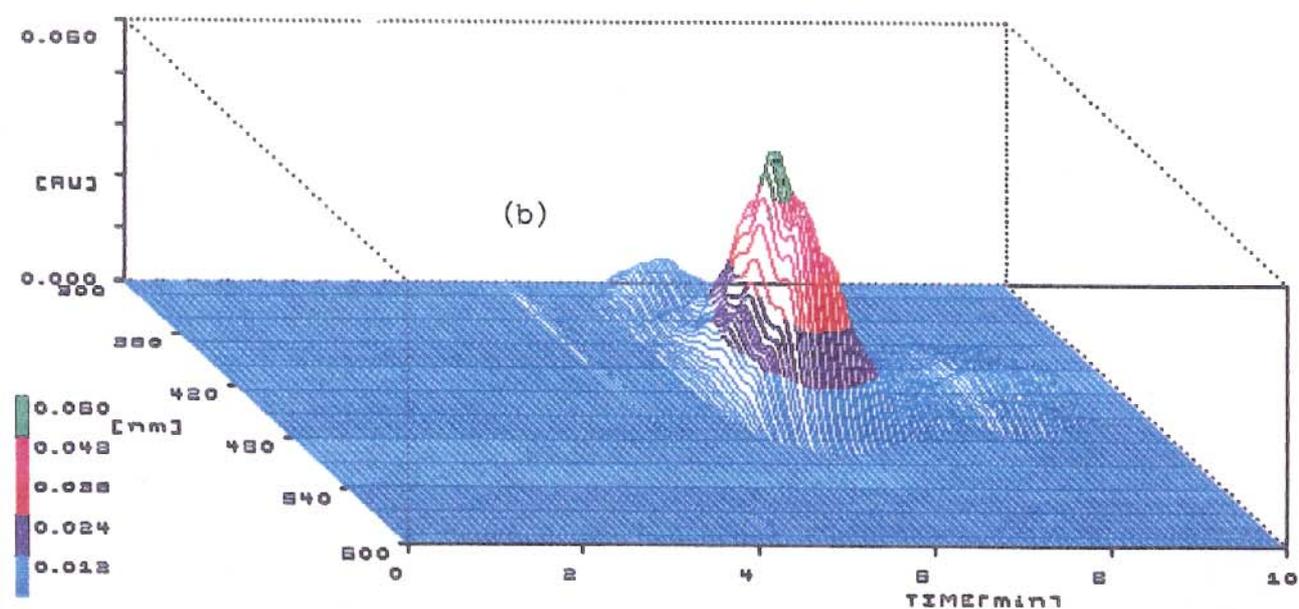
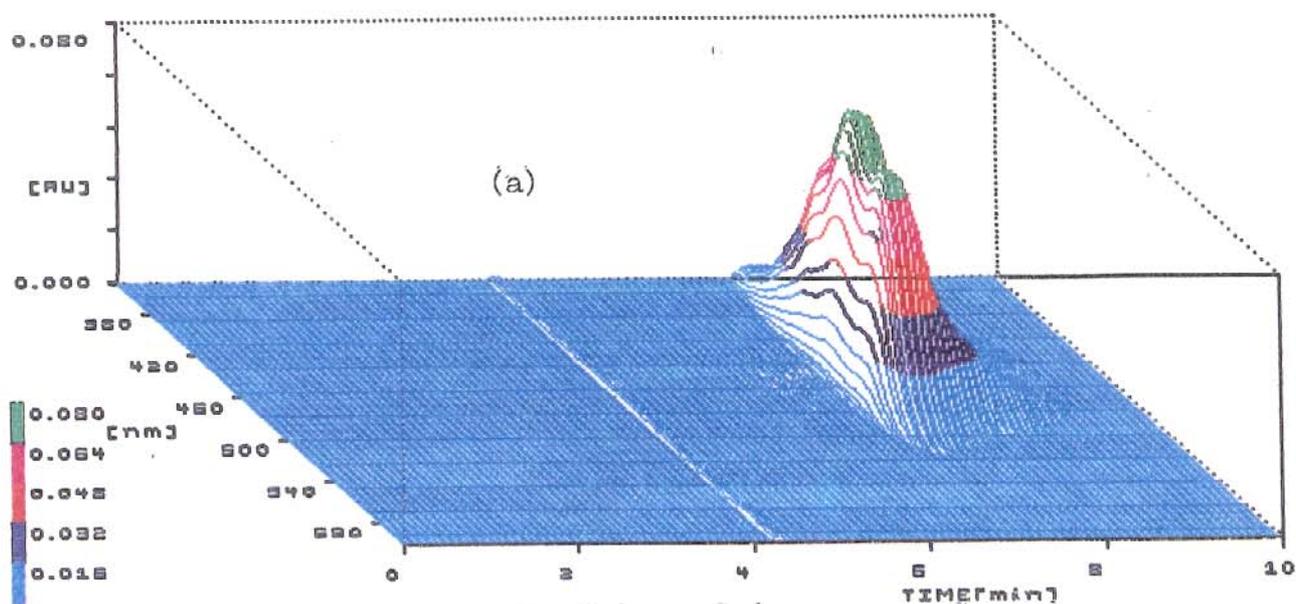


FIGURA 48 - Cromatogramas tridimensionais de  $\alpha$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição isocrática de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min.

## \*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram



## \*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram

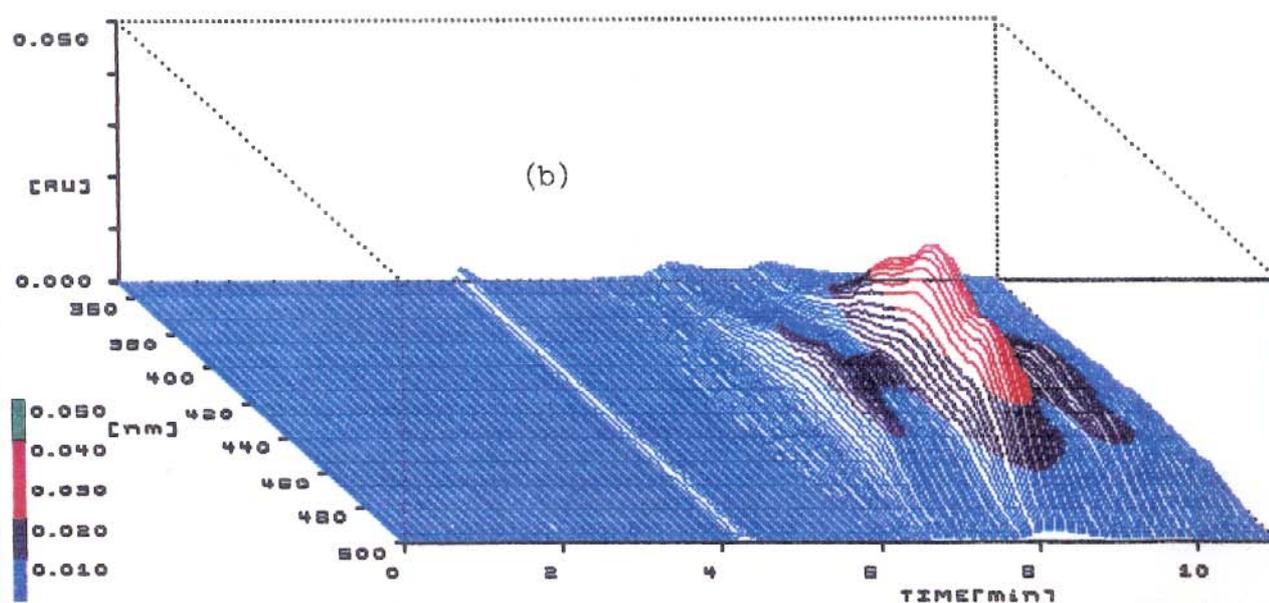


FIGURA 49 - Cromatogramas tridimensionais de  $\beta$ -caroteno, antes (a) e após (b) isomerização química. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição isocrática de n-hexano a uma vazão de 0,5 mL/min.

TABELA 5 - Resultados das análises químicas e físico-químicas das amostras estudadas.

	azeite de dendê	pêssego	laranja	moranga
Sólidos solúveis <sup>1</sup> (°Brix a 20°C)	—	13,2 ± 0,1	10,5 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Umidade (g/100 g) <sup>2</sup>	0,47 ± 0,10 <sup>3</sup>	85,04 ± 0,19	87,50 ± 0,40	91,24 ± 0,37
Sólidos totais (g/100 g) <sup>2</sup>	—	14,96 ± 0,19	12,50 ± 0,40	8,76 ± 0,37
pH <sup>4</sup>	—	3,87 ± 0,01 <sup>5</sup>	3,39 ± 0,24 <sup>5</sup>	6,68 ± 0,08 <sup>6</sup>
Acidez total (g/100 g) <sup>7</sup>	—	0,63 ± 0,01 <sup>8</sup>	0,98 ± 0,11 <sup>9</sup>	0,01 ± 0 <sup>9</sup>

<sup>1</sup> Medido em refratômetro, marca Bausch & Lomb, segundo metodologias n<sup>os</sup> 22.024 e 22.026 da AOAC (WILLIAMS, 1994).

<sup>2</sup> Determinado por aquecimento a 70°C, em estufa a vácuo, marca Heraeus Hanau, segundo metodologia n<sup>o</sup> 22.018 da AOAC (WILLIAMS, 1994).

<sup>3</sup> O resultado refere-se ao conteúdo de umidade e matéria volátil; determinado por aquecimento a 20-25°C, em estufa a vácuo, marca Heraeus Hanau, de acordo com metodologia n<sup>o</sup> 28.002 da AOAC (WILLIAMS, 1994).

<sup>4</sup> Método potenciométrico (pHmetro, marca Micronal, modelo B374), INST. ADOLFO LUTZ (1985).

<sup>5</sup> Medido diretamente na amostra.

<sup>6</sup> Análise realizada em amostra diluída em água, na proporção de 1:2 (uma parte de moranga para duas partes de água).

<sup>7</sup> Determinada pelo método n<sup>o</sup> 22.059 da AOAC (WILLIAMS, 1994).

<sup>8</sup> Expresso em g de ácido málico/100 g de amostra.

<sup>9</sup> Expresso em g de ácido cítrico/100 g de amostra.

**Notas:**

Estas determinações (com exceção da umidade) não se aplicam ao azeite de dendê.

Os resultados da Tabela são médias aritméticas de três determinações, com limite de confiança a 95% de probabilidade.

TABELA 6 - Carotenóides provitamina A encontrados nas amostras avaliadas no estudo.

Amostras	$\alpha$ -caroteno (mg/100g)	13- <i>cis</i> - $\beta$ - caroteno (mg/100g)	<i>trans</i> - $\beta$ - caroteno (mg/100g)	9- <i>cis</i> - $\beta$ - caroteno (mg/100g)	$\beta$ -criptoxantina (mg/100g)	Vitamina A (ER/100g) <sup>1</sup>
<b>Azeite de dendê</b>						
Amostra 1	5,67	1,37	19,58	2,36		4.006
Amostra 2	5,77	1,07	19,23	2,01		3908
Amostra 3	5,42	1,45	19,87	2,11		4.025
$\bar{x}^2$	5,62 $\pm$ 0,45	1,30 $\pm$ 0,50	19,56 $\pm$ 0,80	2,16 $\pm$ 0,45		3980 $\pm$ 156
<b>Pêssego</b>						
Amostra 1		Tr <sup>3</sup>	0,17		0,58	76
Amostra 2		Tr	0,16		0,53	70
Amostra 3		Tr	0,17		0,59	79
$\bar{x}$			0,17 $\pm$ 0,02		0,57 $\pm$ 0,08	75 $\pm$ 11
<b>Laranja</b>						
Amostra 1	0,007	Tr	0,011		0,016	4
Amostra 2	0,009	Tr	0,014		0,020	5
Amostra 3	0,009	Tr	0,011		0,019	4
$\bar{x}$	0,008 $\pm$ 0,003		0,012 $\pm$ 0,004		0,018 $\pm$ 0,005	4 $\pm$ 2
<b>Moranga</b>						
Amostra 1			0,93			154
Amostra 2			0,82			137
Amostra 3			0,94			157
$\bar{x}$			0,90 $\pm$ 0,17			149 $\pm$ 27

<sup>1</sup> ER = Equivalente Retinol/100g

<sup>2</sup> Média aritmética e limite de confiança (com 95% de probabilidade)

<sup>3</sup> Tr = traços (concentrações insuficientes para quantificação)

CARVALHO (1991) avaliou os carotenóides provitamínicos em azeite de dendê refinado, através de cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa ( $C_{18}$ ) com padronização externa e interna (com Sudan I). Segundo o autor, com a coluna  $C_{18}$  utilizada no estudo, não houve uma boa resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno e, deste modo, os valores vitamínicos poderiam estar superestimados.

Desta forma, neste trabalho, dada a devida importância em separar os isômeros para a avaliação vitamínica do azeite de dendê, houve a necessidade de se trabalhar em condições cromatográficas apropriadas para uma máxima separação dos isômeros geométricos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno. Para tanto, utilizou-se um sistema isocrático de eluição com iso-octano, o que propiciou a necessária resolução dos isômeros de  $\beta$ -caroteno (Figura 50).

Os resultados encontrados para o óleo de dendê (Tabela 6) diferem daqueles encontrados por CARVALHO (1991) quando fez uso da padronização externa para quantificar os pigmentos ( $\alpha$ -caroteno =  $7,10 \pm 0,19$  mg/100g;  $\beta$ -caroteno =  $9,21 \pm 0,10$  mg/100g), embora esta diferença, principalmente para o  $\beta$ -caroteno, pode ser explicada, uma vez que não se conhece a procedência do óleo, isto é, a origem e a espécie da palmeira. Além do mais, o teor dos carotenóides no óleo de dendê pode variar com o grau de maturação dos frutos e com as condições de extração e estocagem do óleo (TRUJILLO-QUIJANO, 1988; 1994).

A relação de  $\alpha$ -caroteno/ $\beta$ -caroteno encontrada, não considerando os isômeros geométricos do  $\beta$ -caroteno, foi em média de 1:3,5; com os isômeros a relação passa para 1:4,0. Vale ressaltar que, se não houvesse a resolução dos isômeros do  $\beta$ -caroteno no azeite de dendê e, calculando-se o valor de vitamina A somente como  $\beta$ -caroteno, haveria uma superestimação dos resultados para as

três amostras analisadas em 8,77%, 7,44% e 8,24%, respectivamente, dando uma média de 8,15%.

### **Pêssego**

Dos vários trabalhos sobre a composição de pêssego (“in natura” e processados), poucos relatam a presença de isômeros de  $\beta$ -caroteno. Entre esses, apenas trabalhos como o de CHANDLER e SCHWARTZ (1987), QUACKENBUSH (1987), e recentemente, o de GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA (1994) identificaram isômeros de  $\beta$ -caroteno com a utilização de CLAE. Os estudos retratam uma pequena presença de isômeros.

QUACKENBUSH (1987), usando uma coluna de fase reversa ( $C_{18}$ ) e analisando pêssego processado (enlatado), encontrou 1,02  $\mu\text{g}/100\text{g}$  para o 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, 3,05  $\mu\text{g}/100\text{g}$  para o *trans*- $\beta$ -caroteno e 0,26  $\mu\text{g}/100\text{g}$  para o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Novamente, fazendo uso da mesma coluna, apenas para confirmar a existência dos isômeros *cis* em pêssegos “in natura” (Chileno e cultivar Diamante), GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA (1994) apresentaram resultados variando de  $0,6 \pm 0,2$  a  $1,2 \pm 0,2$   $\mu\text{g}/\text{g}$  para o *trans*- $\beta$ -caroteno,  $0,2 \pm 0,1$   $\mu\text{g}/\text{g}$  para o 13-*cis*- $\beta$ -caroteno e  $0,1 \pm 0,1$   $\mu\text{g}/\text{g}$  para 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, embora a quantificação tenha sido feita espectrofotometricamente usando os coeficientes de absorção específicos de cada isômero, após serem isolados por CCA.

CHANDLER e SCHWARTZ (1987), por meio de uma coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  apresentaram, em porcentagem, os resultados dos isômeros de  $\beta$ -caroteno (9,4% de 13-*cis*, 83,7% de  $\beta$ -caroteno, 6,9% de 9-*cis* para pêssego fresco e 6,8% de 13-*cis*, 79,9% de  $\beta$ -caroteno e 13,3% de 9-*cis* para pêssego processado).

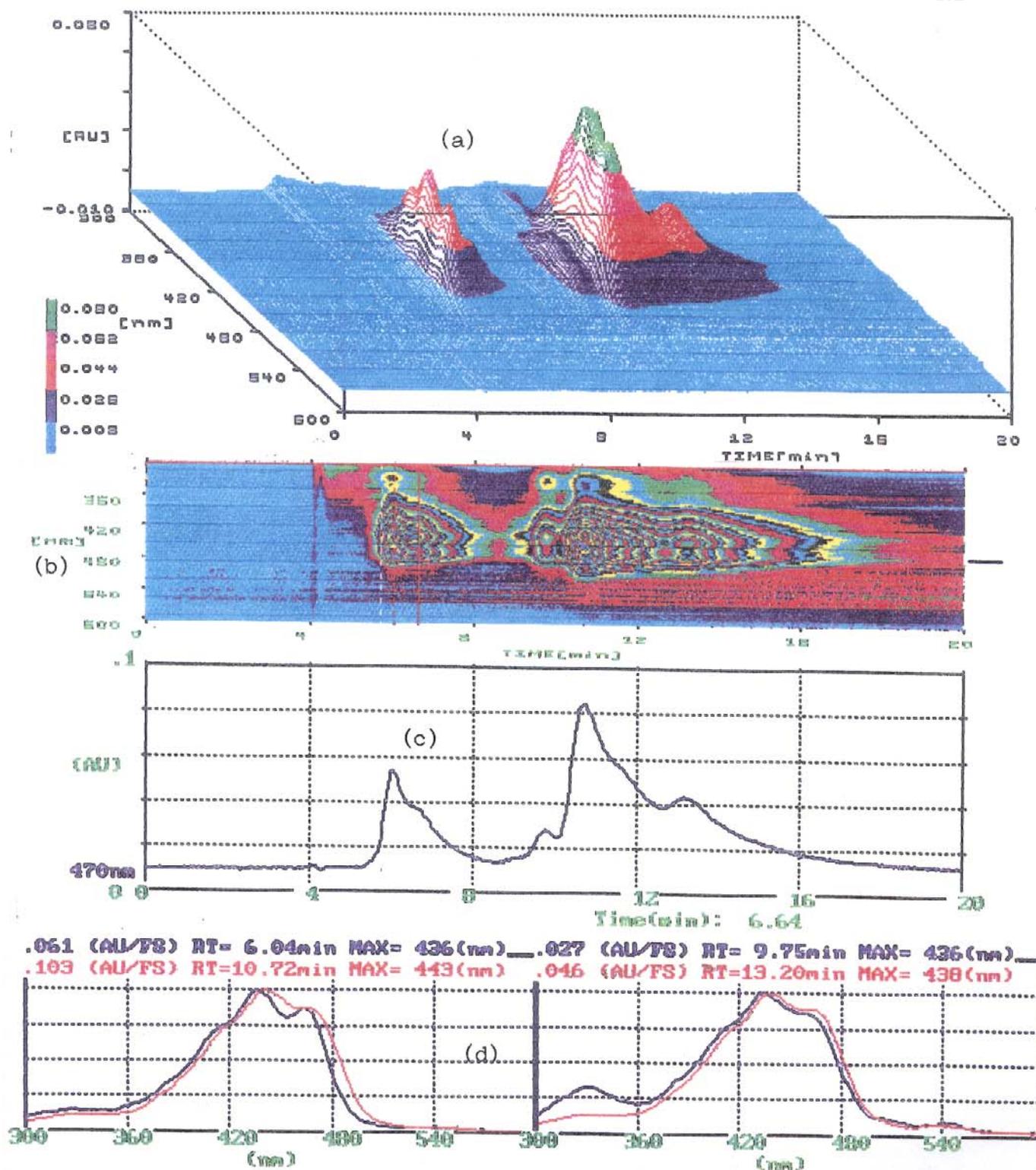


FIGURA 50 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b), bidimensional (c) e espectros de absorção (d) dos picos cromatográficos, com tempos de retenção de 6,04 minutos ( $\alpha$ -Caroteno), 10,72 minutos (trans- $\beta$ -Caroteno), 9,75 minutos (13-cis- $\beta$ -Caroteno) e 13,20 minutos (9-cis- $\beta$ -Caroteno), da amostra de azeite de dendê utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição isocrática de iso-octano a uma vazão de 0,5 mL/min.

Mais especificamente, TAVARES (1991) determinou os carotenóides presente no pêssigo cultivar Rei da Conserva, na forma "in natura", através da técnica CCA e dosagem por leitura espectrofotométrica, estabelecendo o perfil e os teores dos pigmentos, dados a seguir na ordem de eluição nas colunas (MgO e Ca(OH)<sub>2</sub>: 13-*cis*-β-caroteno ( $0,2 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ ), *trans*-β-caroteno ( $1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ ), 9-*cis*-β-caroteno ( $0,09 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ ), ζ-caroteno ( $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ ), neocriptoxantina A ( $1,0 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ ), β-criptoxantina ( $6,4 \pm 2,1 \mu\text{g/g}$ ), luteína ( $3,8 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$ ), zeaxantina ( $1,5 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$ ) e violaxantina ( $0,8 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ ). Dentre estes, os compostos β-caroteno e isômeros e β-criptoxantina e seu isômero *cis*-β-criptoxantina (neocriptoxantina A) exibem atividade biológica.

Apesar de ser eficiente na separação dos isômeros de α- e β-caroteno, a eluição isocrática utilizada neste trabalho, na análise de óleo de dendê, não apresentou o mesmo desempenho na presença de β-criptoxantina. Este importante carotenóide, que é o principal componente provitamínico de certo grupo de frutas, como o pêssigo, é fortemente retido pela fase estacionária, sendo necessário o aumento da polaridade da fase móvel para melhorar a sua eluição. Assim, para a análise de pêssigo, a condição cromatográfica utilizada foi um sistema gradiente de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando com 80% de iso-octano em 60 minutos. Deste modo, foi possível avaliar a baixa presença dos isômeros de β-caroteno e quantificar a β-criptoxantina (Figura 51).

Observando os resultados obtidos para o pêssigo (Tabela 6) e convertendo-os, em média, para μg/g ( $1,65 \pm 0,24 \mu\text{g/g}$  para o β-caroteno e  $5,66 \pm 0,85 \mu\text{g/g}$  para a β-criptoxantina), percebe-se que estão muito próximos daqueles valores determinados por TAVARES (1991) para os mesmos pigmentos e no mesmo cultivar. Da mesma forma, os valores estão próximos aos encontrados por GODOY e RODRIGUEZ AMAYA (1994) (β-caroteno, mencionado acima; β-

criptoxantina,  $4,1 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  para o pêssego Chileno e  $5,1 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$  para o cv. Diamante) apesar de serem outras variedades avaliadas.

A presença do isômero da  $\beta$ -criptoxantina, a neocriptoxantina A<sup>24</sup>, relatada em outros trabalhos (TAVARES, 1991; GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA, 1994 e GEBHARDT *et al.*, 1977), não foi notada neste estudo. Isto pode ser devido à maior sensibilidade da técnica de CCA utilizada nos trabalhos citados. Por outro lado, embora não tenha sido possível a identificação deste isômero nas amostras de pêssego, ficaram registradas as condições cromatográficas para se obter uma separação parcial dos isômeros da  $\beta$ -criptoxantina (Figura 47).

## Laranja

Carotenóides são considerados, em frutas cítricas, os constituintes menores, porém importantes pois lhes conferem cor (princípio fundamental para os seus produtos), além do que, os pigmentos biologicamente ativos tornam-se fontes de vitamina A da dieta.

Tem sido demonstrado que no suco de laranja "in natura", a composição dos carotenóides é uma mistura complexa de vários compostos naturais, na grande maioria hidroxilados, com seus respectivos isômeros, estando presentes, portanto, na forma de ésteres. Alguns destes pigmentos são os carotenos: fitoflueno,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\zeta$ -caroteno e as xantofilas (livres ou esterificadas):  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -criptoxantina (erroneamente assim identificada)<sup>25</sup>, luteína, zeaxantina, anteraxantina, *cis*-anteraxantina, violaxantina e *cis*-violaxantina. Os principais, quanto à concentração, são os 5,6-epóxidos violaxantina e anteraxantina, os quais convertem-se com o calor para os seus correspondentes mono - 5,8 - epóxidos (luteoxantina e mutatoxantina), durante

---

<sup>24</sup> Assim denominada por não ter sua estrutura determinada. As configurações geométricas *cis* da  $\beta$ -criptoxantina por não serem ainda elucidadas, são denominadas como neo A, neo B, neo U, etc., de acordo com a ordem de eluição sobre a coluna (Ver nomenclatura).

<sup>25</sup> Pela descrição de sua estrutura em STEWART (1977 a,b), identificada por ressonância magnética nuclear e espectro de massas, parece tratar-se da zeinoxantina, já que um grupo OH situa-se no anel  $\beta$ -ionona.

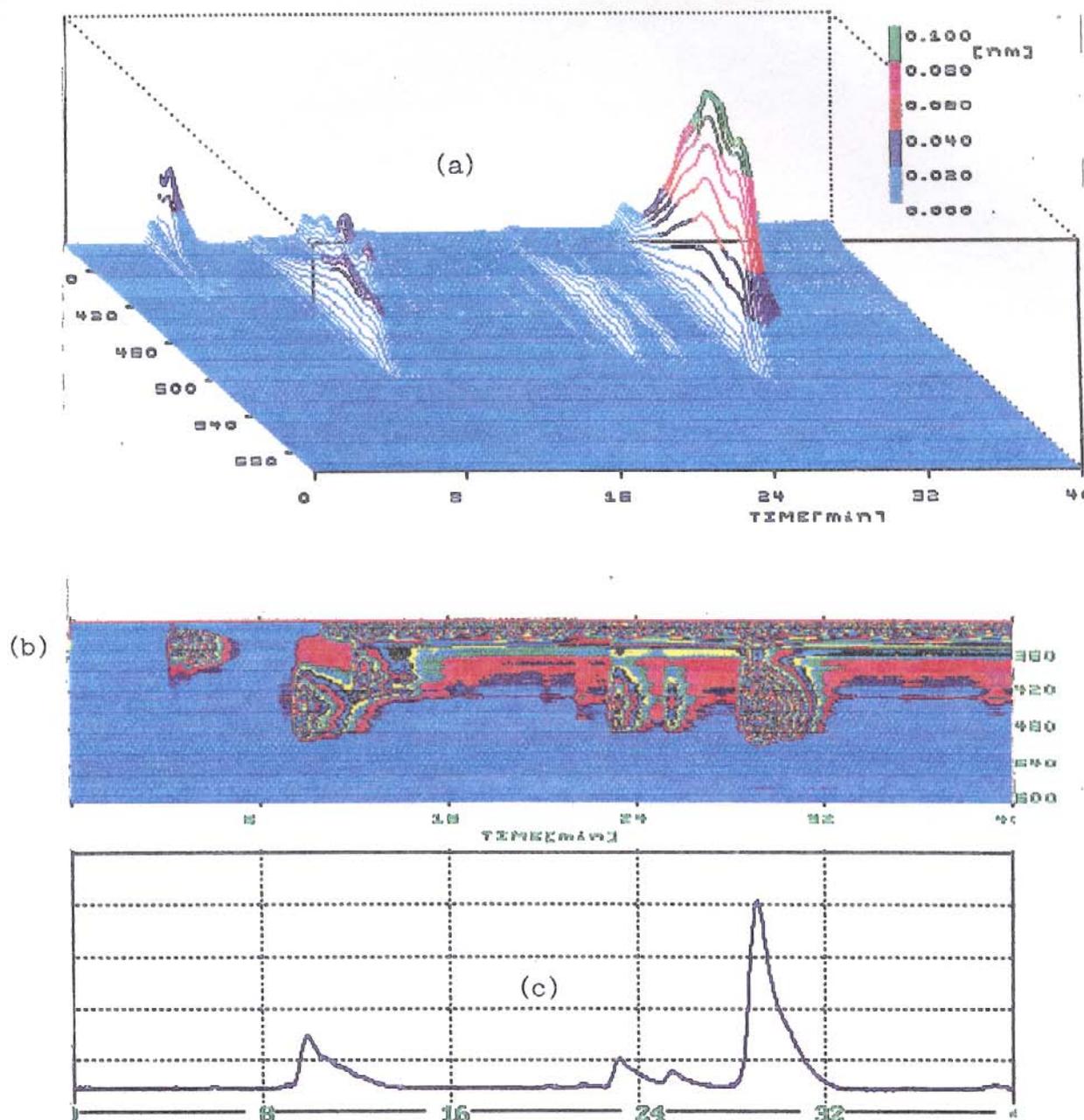


FIGURA 51 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de pêssgo utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Os pigmentos identificados foram:  $\beta$ -caroteno (9,84 min.) e  $\beta$ -criptoxantina (29,28 min.).

o processo de concentração do suco (PHILIP *et al.*, 1989). Contudo, do ponto de vista nutricional, os mais importantes são os  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina. Segundo REEDER e PARK (1975), estes três compostos juntos perfazem apenas de 12 a 14% do conteúdo dos carotenóides totais do suco da laranja.

Nosso propósito, desde o início, foi o de analisar somente os compostos ativos e, conseqüentemente, a nossa atenção foi concentrada sobre os mesmos. Assim, as análises foram realizadas no suco de frutas frescas da variedade Pêra, extraído com o auxílio de um espremedor. Os valores de carotenóides provitamina A determinados se encontram na Tabela 6.

STEWART (1977 b), com a demonstração em sua pesquisa sobre os teores dos pigmentos de sete cultivares analisados, tornou claro a imensa variação dos teores dos carotenóides em relação às variedades e ao grau de maturação das frutas. Independente disto, os valores de carotenóides provitamínicos por nós encontrados ( $\alpha$ -caroteno -  $8 \pm 3 \mu\text{g}/100\text{g}$ ;  $\beta$ -caroteno -  $12 \pm 4 \mu\text{g}/100\text{g}$ ;  $\beta$ -criptoxantina -  $18 \pm 5 \mu\text{g}/100\text{g}$ ), são semelhantes aos publicados pelo autor, para o cultivar Orlando ( $\alpha$ -caroteno -  $9,0 \pm 0,1 \mu\text{g}/100\text{g}$ ;  $\beta$ -caroteno -  $15,9 \pm 0,0 \mu\text{g}/100\text{g}$ ;  $\beta$ -criptoxantina -  $24,0 \pm 1,1 \mu\text{g}/100\text{g}$ ), em um dado período do estágio de maturação, em que as proporções de  $\alpha$ -caroteno/ $\beta$ -caroteno e de  $\beta$ -caroteno/ $\beta$ -criptoxantina estão próximas de 1:2.

Estimando as proporções de  $\alpha$ -caroteno/ $\beta$ -caroteno e de  $\beta$ -caroteno/ $\beta$ -criptoxantina, por nós encontradas (tanto  $\alpha$ -caroteno/ $\beta$ -caroteno como  $\beta$ -caroteno/ $\beta$ -criptoxantina se relacionam na ordem de 1:2), percebe-se que são coincidentes com as proporções dos pigmentos, acima mencionadas, para o cv. Orlando. Em outra pesquisa, também desenvolvida por STEWART (1977 a), que analisou o mesmo cultivar Orlando, as proporções dos pigmentos  $\alpha$ -caroteno/ $\beta$ -caroteno encontram-se nesta mesma relação de 1:2, embora em concentrações bem abaixo da metade dos teores por nós determinados.

No nosso trabalho foi possível identificar também a presença de um dos isômeros de  $\beta$ -caroteno, não quantificado por estar em baixa concentração (Figura 52).

## SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram

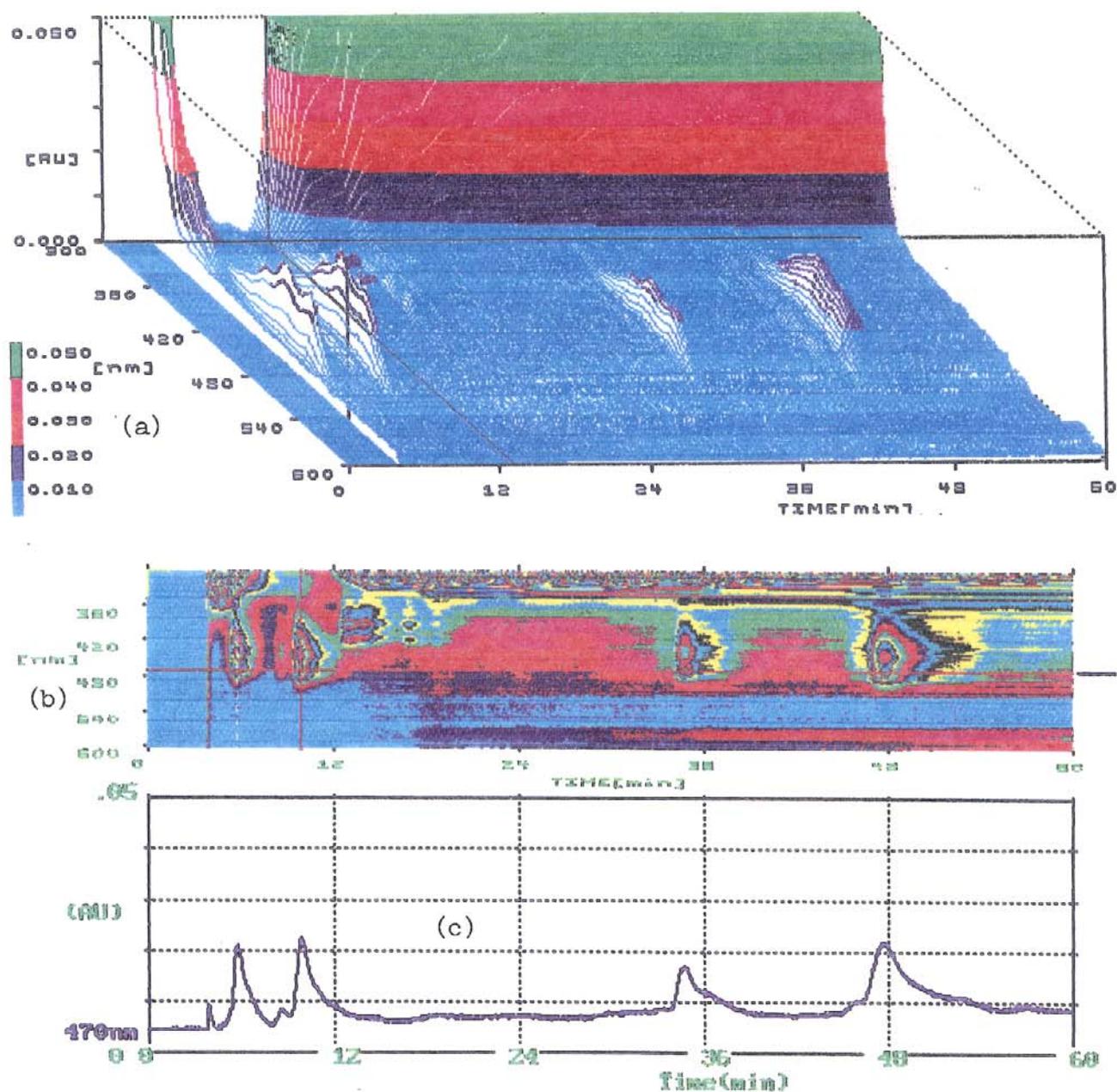


FIGURA 52 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de laranja utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Carotenóides provitamínicos identificados:  $\alpha$ -caroteno (5,76 min.); 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (8,64 min.); *trans*- $\beta$ -caroteno (9,84 min.) e  $\beta$ -criptoxantina (34,80 min.).

## Moranga

ARIMA (1987), utilizando CCA em seu estudo e analisando cinco amostras de moranga "in natura", da espécie *Curcubita maxima*, cv. Exposição, coletadas em épocas diferentes, chegou a detectar 17 diferentes carotenóides. Os pigmentos determinados, na ordem de eluição nas colunas usadas (MgO e alumina), com as respectivas variações das concentrações, em  $\mu\text{g/g}$ , foram:  $\alpha$ -caroteno (nd<sup>26</sup> - 0,2),  $\beta$ -caroteno (3,1 - 28,0), *cis*- $\zeta$ -caroteno (nd - 0,6), mutacromó (nd - 0,4), pigmento A não identificado (tr<sup>27</sup> - 0,8), pigmento B não identificado (nd - 3,8),  $\beta$ -criptoxantina (nd - 0,8),  $\alpha$ -criptoxantina (nd - 3,5), 5,8-monoepoxi- $\alpha$ -criptoxantina (nd - 0,1), taraxantina (5,6-monoepoxi-luteína) (nd - 3,6), violaxantina (nd - 25,8), neoxantina (nd - 4,2), *cis*-luteína (nd - 9,7), luteína (7,2 - 25,3), zeaxantina (nd - 9,7), *cis*-luteoxantina (nd - 0,9) e 3,3',4'- triidroxil- $\alpha$ -caroteno (nd - 0,1), em um total médio de 46,0  $\mu\text{g/g}$  de pigmentos. O carotenóide presente em maior concentração foi o  $\beta$ -caroteno na forma *trans* (média de 16,6  $\mu\text{g/g}$ ), sem a presença de seus isômeros geométricos, correspondendo a 36,2% do total dos pigmentos carotenóides. Os compostos vindos a seguir, na ordem decrescente de concentração, foram a luteína, violaxantina e zeaxantina, proporcionais a 29,3, 17,9 e 5,2%, respectivamente, seguidos da  $\alpha$ -criptoxantina e taraxantina (2,4 e 2,2%); os demais foram encontrados em baixas quantidades. Dentre esta composição bastante complexa, os compostos que contribuem para o valor de vitamina A, conforme as suas quantidades presentes e considerando as atividades biológicas de cada um, são:  $\alpha$ -caroteno (0,3%),  $\beta$ -caroteno (95,4%), mutacromó (0,3%),  $\alpha$ -criptoxantina (3,2%) e  $\beta$ -criptoxantina (0,8%).

Outros trabalhos utilizando CLAE, como o de CHANDLER e SCHWARTZ (1987), que fizeram uso de coluna de hidróxido de cálcio, encontraram em abóbora fresca (não citando a variedade) 13-*cis*-, 9-*cis*-, e *trans*- $\beta$ -caroteno nas proporções de 15,3%, 9,7% e 75%, respectivamente. Por outro lado, BUSHWAY (1986), durante a determinação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno em algumas frutas e vegetais crus, usando coluna octadecil e analisando inclusive isômeros, detectou em abóboras provenientes de diferentes áreas de comercialização, apenas  $\beta$ -caroteno. KHACHIK e BEECHER (1988), analisando carotenóides livres e complexados em algumas morangas da espécie *C. maxima* e em seus produtos,

<sup>26</sup> nd - não detectado.

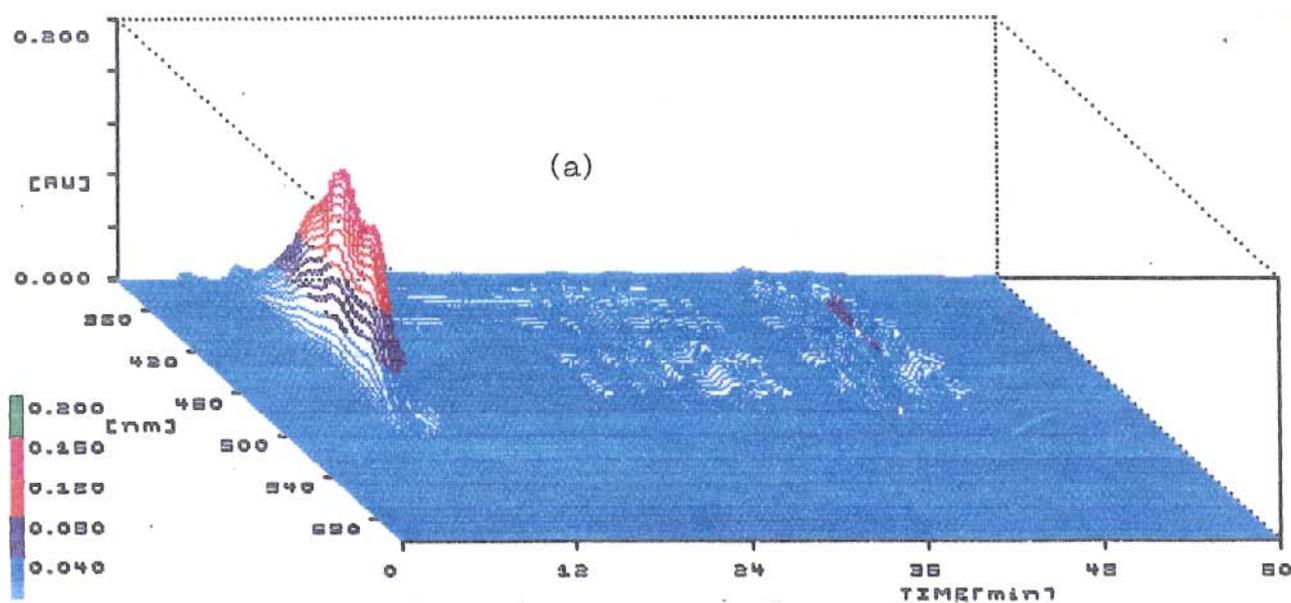
<sup>27</sup> tr - traços

ambos destinados à alimentação infantil, encontraram como principais componentes carotenóides a luteína, suas várias formas ésteres,  $\beta$ -caroteno e seu isômero 15,15'-*cis*- $\beta$ -caroteno. Como instrumentos de separação usaram coluna de fase reversa ( $C_{18}$ ) e uma combinação de procedimentos isocrático e gradiente de eluição, observando que os níveis dos pigmentos foram diferentes para a mesma variedade de moranga, quando nativas de diferentes locais. Os pesquisadores sugeriram que tais diferenças dos teores de carotenóides foram devido à combinação de fatores genéticos, meio ambiente e nutrição das plantas.

HOLMES *et al.* (1948) já haviam mencionado este fato num estudo com variedades de abóboras e morangas de inverno. Os resultados demonstraram uma variação na composição dos carotenos entre as variedades, até mesmo dentro de uma única espécie, apesar das plantas terem sido cultivadas no mesmo solo e tratadas com as mesmas quantidades e tipo de nutrientes. Estas variações podem ser vistas, nos resultados obtidos por ARIMA (1987).

Apesar destas colocações, neste estudo, os valores encontrados (Tabela 6) estão entre os relatados por ARIMA (1987) e, da mesma forma, não foram detectadas as presenças dos isômeros *cis* do  $\beta$ -caroteno. O conteúdo médio do composto predominante ( $\beta$ -caroteno) por nós determinado ( $0,90 \pm 0,17$  mg/100g), se enquadra na faixa de 0,31 a 2,80 mg/100g, determinada por ARIMA. A Figura 53 apresenta um cromatograma típico das amostras de morangas estudadas.

SPD-N6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram



SPD-N6A POST ANALYSIS Contour Plot

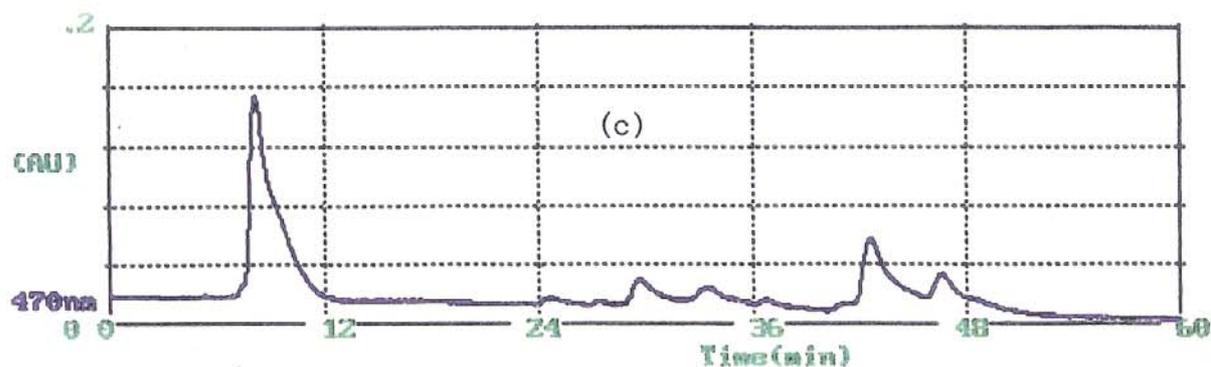
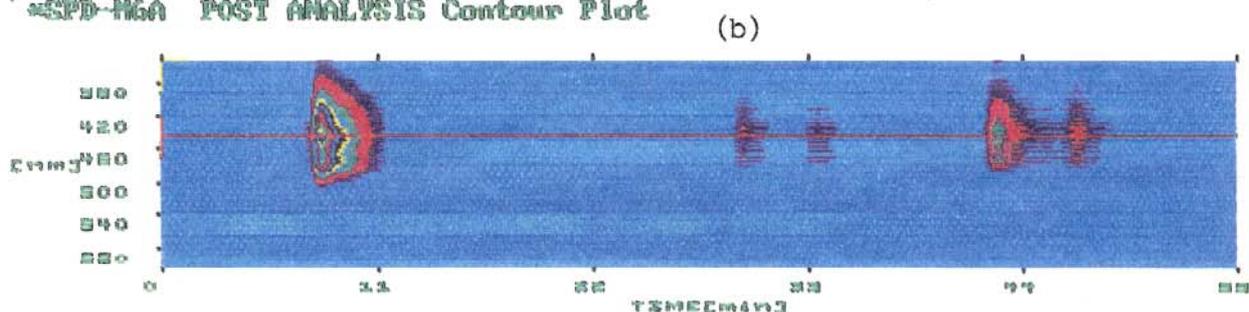


FIGURA 53 - Cromatogramas tridimensional (a), planar (b) e bidimensional (c) da amostra de moranga utilizada neste estudo. Coluna de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com eluição gradiente de uma mistura de iso-octano e acetona, iniciando com 100% de iso-octano e terminando em 60 minutos com iso-octano e acetona (80:20), com uma vazão de 0,5 mL/min. Carotenóide provitamínico identificado:  $\beta$ -caroteno (8,28 min.)

## 5 CONCLUSÃO

Embora a coluna de  $\text{Ca(OH)}_2$  tenha apresentado melhor separação dos isômeros geométricos estudados é necessário otimizar a resolução de outros carotenóides provitamínicos não observados neste estudo. Além disso, a indisponibilidade deste tipo de coluna no mercado dificulta sua utilização por laboratórios que não estejam capacitados para o recheio de coluna.

As colunas de fase reversa, utilizadas com eficiência em alguns casos na separação de isômeros de carotenóides provitamínicos, se limitam ainda a poucas unidades de algumas marcas comerciais, tornando necessário estudo que esclareça esta característica e fazendo com que quem trabalha nesta área tenha alternativas à disposição.

A coluna de hidróxido de cálcio apresentou-se como um instrumento eficiente para a avaliação de carotenóides provitamínicos, inclusive pela separação de isômeros que, quando não separados, potencializam em alguns casos, os valores vitamínicos finais.

A utilização de um sistema de gradiente neste estudo, permitiu a avaliação de xantofilas como a  $\beta$ -criptoxantina. Todavia, este mesmo sistema gradiente provoca uma demanda de tempo bastante grande, entre as injeções, para o acondicionamento à fase inicial. Há, portanto, a necessidade de se continuar os estudos com colunas de hidróxido de cálcio, procurando otimizar a resolução de outros isômeros e diminuir o tempo de análise, bem como estabelecer um padrão interno adequado para as condições cromatográficas estudadas.

Pela complexidade dos carotenóides, geralmente presentes nas amostras de alimentos, é muito difícil um único procedimento cromatográfico para as suas determinações, sendo necessário, nestes casos, a priorização dos pigmentos a serem analisados e a utilização de métodos complementares, como a CCA.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIMA, H. K. Composição de carotenóides de curcubitáceas brasileiras. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 1987, 186 p.
- BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. *J. Agric. Food Chem.*, **20**: 456-473, 1972.
- BIACS, P. A.; DAOOD, H. G.; PAVISA, A. & HAJDU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L. var. Sz-20). *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 350-353, 1989.
- BICKOFF, E. M.; ATKINS, M. E.; BAILEY, G. F. & STITT, F. Stereoisomeric analysis of  $\beta$ -carotene. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **32**: 766-74, 1949.
- BRAUMAN, T. & GRIMME, L. H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **637**: 8-17, 1981.
- BRITTON, G. Biosynthesis of carotenoids. In: *Plant Pigments*. GOODWIN, T. W. (Ed.), Academic Press, London & New York, 1988, p.133-182.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: *Methods of Plant Biochemistry*. CHARLWOOD, B. & BANTHORPE, D. (Eds.), vol. 7. Academic Press, London, 1991, p. 473-518.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: *Natural Food Colorants*. HENDRY, G. F. (Ed.), Blackie, London, 1992, p. 141-182.
- BRITTON, G. Structure and nomenclature of carotenoids. In: *Carotenoids in Photosynthesis*. YOUNG, A. & BRITTON, G. (Eds.), Chapman and Hall, London, 1993, p. 1-15.

- BRUBACHER, G.; MULLER-MULOT, W. & SOUTHGATE, D. A. T. *Methods for the determination of vitamins in food*. Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985, p. 33-50.
- BUREAU, J. L. & BUSHWAY, R. J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food. Sci.*, **51**: 128-130, 1986.
- BUSHWAY, R. J. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 409-412, 1986.
- BUSHWAY, R. J. & WILSON, A. M. Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **15**: 165-169, 1982.
- CARVALHO, P. R. N. Determinação de carotenóides provitamina A por cromatografia em coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência . Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 1991, 77 p.
- CARVALHO, P. R. N.; COLLINS, C. H. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **33**: 133-137, 1992.
- CHANDLER, L. A. & SCHWARTZ, S. J. HPLC separation of *cis-trans* isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.*, **52**: 669-672, 1987.
- CHANDLER, L. A. & SCHWARTZ, S. J. Isomerization and losses of *trans*- $\beta$ -carotene in sweet potatoes, as affected by processing treatments. *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 129-133, 1988.

- DAOOD, H. G.; BIACS, P. A.; HOSCHKE, A.; HARKEY-VINKLER, M. & HAJDU, F. Separation and identification of tomato fruit pigments by TLC and HPLC. *Acta Alimentaria*, **16**: 339-350, 1987.
- DAOOD, H. G.; CZINKOTAI, B.; HOSCHKE, A. & BIACS, P. A. High-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables. *J. Chromatogr.*, **472**: 296-302, 1989.
- DAVIES, B. H. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. GOODWIN, T. W. (Ed.), 2nd ed., vol. 2. Academic Press, London, 1976, p. 38-165.
- DEUEL Jr., H. J., Carotenoids and related compounds. In: *The Lipids, their Chemistry and Biochemistry*, vol. I. Interscience Publishers, New York, 1951, p. 507-666.
- DEUEL JR., H. J.; JOHNSTON, C. H.; MESERVE, E. R.; POLGÁR, A. & ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity IV. *Neo- $\alpha$ -carotene B and neo- $\beta$ -carotene B*. *Arch. Biochem.*, **7**: 247-255, 1945b.
- DEUEL JR., H. J.; JOHNSTON, C. H.; SUMNER, E.; POLGÁR, A. & ZECHMEISTER, L. Stereochemical configurations and provitamin A activity I. *All-trans- $\beta$ -carotene and neo- $\beta$ -carotene U*. *Arch. Biochem.*, **5**: 107-114, 1944.
- DEUEL JR., H. L.; SUMNER, E.; JOHNSTON, C., H.; POLGÁR, A. & ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity III. *All-trans- $\alpha$ -carotene and neo- $\alpha$ -carotene U*. *Arch. Biochem.*, **6**: 157-161, 1945a.

- EDWARDS, C. G. & LEE, C. Y. Measurement of provitamin A carotenoids in fresh and canned carrots and green peas. *J. Food Sci.*, **51**: 534-535, 1986.
- EMODI, A. Carotenoids: Properties and applications. *Food Technol.*, **32**: 38-42, 1978.
- GEBHARDT, S. E.; ELKINS, E. R. & HUMPHREY, J. Comparasion of two methods for determining the vitamin A value of clingstone peaches. *J. Agric. Food Chem.*, **25**: 629-632, 1977.
- GILLAN, F. T. & JOHNS, R. B. Normal-phase HPLC analysis of microbial carotenoids and neutral lipids. *J. Chromatogr. Sci.*, **21**: 34- 8, 1983.
- GODOY, H. T. Mudanças na composição de carotenóides durante processamento térmico e estocagem de manga (*Mangifera indica*) e mamão (*Carica papaya*). Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 1985, 111 p.
- GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in brazilian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1306-1313, 1994.
- GOODWIN, T. W. (Ed.). *Carotenoids, their comparative biochemistry*. Chemical Publishing Co. Inc., New York, 1954, 356 p.
- GOODWIN, T. W. Biosynthesis. In: *Carotenoids*. ISLER, O. (Ed.), Birkhäuser, Basel, 1971, p. 577-636.
- GORDON, H. T. & BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colorants. *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **18**: 59-97, 1982.

- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. & ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 2135-2140, 1992.
- GREGORY, G. K.; CHEN, T. S. & PHILIP, T. Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: Red bell peppers. *J. Food. Sci.*, **52**: 1071-1073, 1987.
- HAIJIBRAHIM, S. K.; TIBBETS, P. J. C.; WATTS, C. D.; MAXWELL, J. R. & EGLINTON, G. Analysis of carotenoid and porphyrin pigments of geochemical interest by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **50**: 549-553, 1978.
- HEINONEN, M. I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E. V.; VARO, P. T. & KOIVISTOINEN, P. E. Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 655-659, 1989.
- HOLMES, A. D.; SMITH, C. T. & LACHMAN, W. H. Variation in composition of winter squashes. *Food Res.*, **13**: 123-127, 1948.
- HSIEH, Y. P. C. & KAREL, M. Rapid extraction and determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes in foods. *J. Chromatogr.*, **259**: 515-518, 1983.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análises de alimentos, vol. 1, 3ª ed., São Paulo, 1985, 533 p.
- ISLER, O. (Ed.) Carotenoids: Introduction. In: *Carotenoids*. Birkhäuser, Basel, 1971, p. 11-27.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Tentative Rules for the Nomenclature of Carotenoids. *Biochem. J.*, **127**: 741-752, 1972.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of Carotenoids (Rules approved 1974). *Pure Appl. Chem.*, **41**: 407-431, 1975.

JOHNSON, R. M. & BAUMANN, C. A. Storage and distribution of vitamin A in rats fed certain isomers of carotene. *Arch. Biochem.*, **14**: 361-367, 1947.

KHACHIK, F. & BEECHER, G. R. Separation and identification of carotenoids and carotenal fatty acid in some squash products by liquid chromatography. 1. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 929-937, 1988.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R. & LUSBY, W. R. Separation, identification and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe and pink grapefruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 1465-1473, 1989.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R. & WHITTAKER, N. F. Separation, identification and quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 603-616, 1986.

KHACHIK, F.; GOLI, M. B.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W. R.; TENORIO, M. D. & BARRERA, M. R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoids constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 390-398, 1992.

- KLÄUI, H. & BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colors. In: *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. BAUERNFEIND, J. C. (Ed.), Academic Press, New York, 1981, p. 47-317.
- LAMBERT, W. E.; NELIS, H. J.; DE RUYTER, M. G. M. & DE LEENHEER, A. P. Vitamin A: Retinol, carotenoids, and related compounds. In: *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*. DE LEENHEER, A. P.; LAMBERT, W. E. & DE RUYTER, M. G. M. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1985, p. 1-72.
- LEE, C. Y. Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. *Food Chem.*, **20**: 285-293, 1986.
- LEE, C. Y.; McCOON, P. E. & LEBOWITZ, J. M. Vitamin A value of sweet corn. *J. Agric. Food Chem.*, **29**: 1294-1295, 1981.
- LEE, C. Y.; SMITH, N. L. & ROBINSON, R. W. Carotenoids and vitamin A value of fresh and canned winter squashes. *Nutr. Repts. Int.*, **29**: 129-133, 1984.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. Ed. Sarvier, São Paulo, 1989, 725 p.
- MERCADANTE, A. Z. Estudo de carotenóides por espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência. Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas, 1994, 152 p.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GANDUL-ROJAS, B. & GALLARDO-GUERRERO, M. L. Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin oil by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 60-63, 1992.

- NAS - NCR. *Recommended Dietary Allowances*, 9th ed., National Academy of Sciences - National Research Council, Washington, DC, 1980, p. 55-71.
- NOBILE, S. The carotenoids in colouring farinaceous substances - Applications and assay methods. Paper presented at the 12th Annual Conference of the Cereal Chemistry Group of the Royal Australian Chemical Institute, Canberra, 1962.
- OGUNLESI, A. T. & LEE, C. Y. Effect of processing on the stereoisomerization of major carotenoids and vitamin A value of carrots. *Food Chem.*, **4**: 311-318, 1979.
- OLSON, J. A. The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A). *J. Lipid Res.*, **5**: 281-299, 1964.
- OLSON, J. A. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *J. Nutri.*, **119**: 105-108, 1989.
- OLSON, J. A. & LAKSHMANAN, M. R. Enzymatic transformation of vitamin A; with particular emphasis on carotenoid cleavage. In: *The fat-soluble vitamins*. DELUCA, H. F. & SUTTIE, J. W. (Eds.), University of Wisconsin Press, Madison, 1970, p. 213-226.
- PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J. D. & SPORN, M. P. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, **290**: 201-208, 1981.
- PFANDER, H.; RIESEN, R. & NIGGLI, U. HPLC and SFC of carotenoids - scope and limitations. *Pure Appl. Chem.*, **66**: 947-954, 1994.

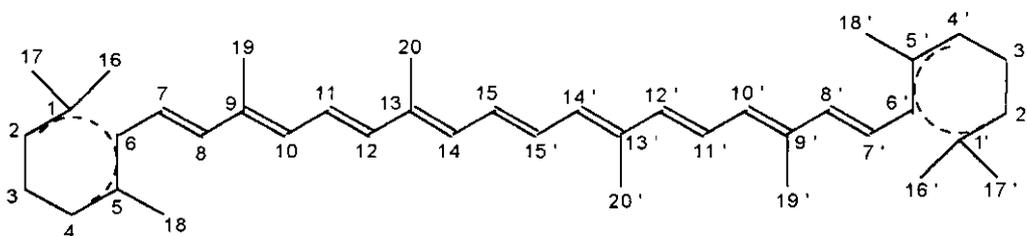
- PHILIP, T.; CHEN, T. S. & NELSON, D. B. Detection of adulteration of California orange juice concentrates with externally added carotenoids by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 90-95, 1989.
- PITT, G. A. J. Vitamin A. In: *Carotenoids*. ISLER, O. (Ed.), Birkhäuser, Basel and Stuttgart, 1971, p. 717-742.
- QUACKENBUSH, F. W. Use of heat to saponify xanthophyll esters and speed analysis for carotenoids in feed material: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**: 748-753, 1973.
- QUACKENBUSH, F. W. Reverse phase HPLC separation of *cis* and *trans* carotenoids and its application to  $\beta$ -carotenes in food materials. *J. Liq. Chromatogr.*, **10**: 643-653, 1987.
- QUACKENBUSH, F. W. & SMALLIDGE, R. L. Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantitation of provitamins A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**: 767-772, 1986.
- REEDER, S. K. & PARK, G. L. A specific method for determination of provitamin A carotenoids in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**: 595-598, 1975.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J. Micronutr. Anal.*, **5**: 191-225, 1989.
- RODRIGUEZ, D. B.; RAIMUNDO, L. C.; LEE, T. C.; SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica carantia* fruits. *Ann. Bot.*, **40**: 615-624, 1976.
- RÜEDI, P. HPLC - a powerful tool in carotenoid research. *Pure Appl. Chem.*, **57**: 793-800, 1985.

- SCOTT, K. J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.*, **45**: 357-364, 1992.
- SCOTT, K. J. & HART, D. J. Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC-2: column temperature. *Food Chem.*, **47**: 403-405, 1993.
- SIMPSON, K. L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.*, **42**: 7-17, 1983.
- SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.*, **1**: 351-374, 1981.
- SIMPSON, K. L.; TSOU, S. C. S. & CHICHESTER, C. O. Carotenes. In: *Methods of Vitamin Assay*. AUGUSTIN, J.; KLEIN, B. P.; BECKER, D. A. & VENUGOPAL, P. B. (Eds.), 4th ed. John Wiley, New York, 1985, p.185-220.
- SPEEK, A. J.; TEMALILWA, C. R. & SCHRIJUER, J. Determination of  $\beta$ -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem.*, **19**: 65-74, 1986.
- ST. LOUIS, R. H. & WILDER, D. R. The rapid separation of *cis-trans* isomers of cyclohexanedimethanoldibenzoate using subambient high performance liquid chromatography. *LC-GC*, **9**: 483-485, 1981.
- STEWART, I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**: 132-136, 1977a.
- STEWART, I. Provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *J. Agric. Food Chem.*, **25**: 1132-1137, 1977b.

- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. Separation of carotene stereoisomers in vegetables. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**: 937-940, 1970.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. Effect of processing on provitamin A in vegetables. *J. Am. Diet. Assoc.*, **59**: 238-243, 1971a.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. Effects of selected herbicides on provitamin A content in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **19**: 854-856, 1971b.
- SWEENEY, J. P. & MARSH, A. C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J. Nutr.*, **103**: 20-25, 1973.
- TAVARES, C. A. Composição de carotenóides e valor de vitamina A em tomate, milho, pêssigo e seus produtos processados. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 1991, 127 p.
- TAYLOR, F. R. Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv. Chromatogr.*, **22**: 157-213, 1983.
- TEE, E. S. Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Food Sci. Nutr.*, **31**: 103-163, 1992.
- THOMMEN, H. Metabolism: In: *Carotenoids*. ISLER, O. (Ed.), Birkhäuser, Basel, 1971, p. 637-668.
- TRUJILLO-QUIJANO, J. A. Produção de extratos concentrados de carotenóides a partir de óleo de dendê. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 1988, 153 p.

- TRUJILLO-QUIJANO, J. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; ESTEVES, W.; PLONIS, G. F. Carotenoid composition and vitamin A value of oils from four Brazilian palm fruits. *Fat Sci. Technol.*, **92**: 222-226, 1990.
- TRUJILLO-QUIJANO, J. A. Aproveitamento integral do óleo de palma (*Elaeis guineensis*, Jacq.). Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas, 1994, 199 p.
- TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T. & KOYAMA, Y. Separation and determination of *cis/trans*- $\beta$ -carotenes by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **245**: 359-364, 1982.
- VECCHI, M.; ENGLERT, G.; MAURER, R. & MEDUNA, V. Trennung und charakterisierung von  $\beta$ -carotin-isomeren. *Helv. Chim. Acta*, **64**: 2746-2758, 1981.
- WEEDON, B. C. L. Occurrence. In: *Carotenoids*. ISLER, O. (Ed.), Birkhäuser, Basel, 1971, p. 29-59.
- WILLIAMS, S. (Ed.). *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1984. 1141p.
- WOLF, G. Is dietary  $\beta$ -carotene an anticancer agent? *Nutr. Rev.*, **40**: 257-261, 1982.
- ZAKARIA, M., SIMPSON, K. L.; BROWN, P. R. & KRSTULOVIC, A. Use of reversed-phase, high performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J. Chromatogr.*, **176**: 109-117, 1979.
- ZECHMEISTER, L. *Cis-Trans Isomeric Carotenoids Vitamins A and Arylpolyenes*. Academic Press, London, 1962, 251 p.

## ANEXO I



Nome trivial e semi-sistemáticos dos carotenóides mencionados neste trabalho.

Nome trivial	Nome semi-sistemático
Ácido $\beta$ -apo-8'-carotenóico	Ácido 8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-óico
Ácido $\beta$ -apo-10'-carotenóico	Ácido 10'-apo- $\beta$ -caroten-10'-óico
Ácido $\beta$ -apo-12'-carotenóico	Ácido 12'-apo- $\beta$ -caroten-12'-óico
Ácido $\beta$ -apo-14'-carotenóico	Ácido 14'-apo- $\beta$ -caroten-14'-óico
Actinioeritrina	3,3'-Bisacilóxi-2,2'-dinor- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4'-diona
Anteraxantina	5,6-Epóxi-5,6-diidro- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-3,3'-diol
$\beta$ -Apo-2'-carotenal	3',4'-Didesidro-2'-apo- $\beta$ -caroten-2'-al
$\beta$ -Apo-8'-carotenal ( $\beta$ -Apo-2-carotenal, $\beta$ -Carotenal)	8'-Apo- $\beta$ -caroten-8'-al
$\beta$ -Apo-10'-carotenal ( $\beta$ -Apo-3-carotenal)	10'-Apo- $\beta$ -caroten-10'-al
$\beta$ -Apo-12'-carotenal ( $\beta$ -Apo-4-carotenal)	12'-Apo- $\beta$ -caroten-12'-al
$\beta$ -Apo-14'-carotenal	14'-Apo- $\beta$ -caroten-14'-al

(continua)

## ANEXO I (continuação)

Nome trivial	Nome semi-sistemático
Apo-2-licopenal (Apo-6'-licopenal)	6'-Apo- $\psi$ -caroten-6'-al
Astaxantina	(3S,3S')-3,3'-Diidro- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona
Aurocromo ( $\beta$ -Caroteno-5,8:5',8'-difuranóxido)	5,8:5',8'-Diepóxi-5,8,5',8'-tetraidro- $\beta,\beta$ -caroteno
3,4,3',4'-Bisdesidro- $\beta$ -caroteno	3,4,3',4'-Didesidro- $\beta,\beta$ -caroteno
1,1'-Bisdimetil-1,1'-bisetil- $\beta$ -caroteno	1,1'-Bisdimetil-1,1'-bisetil- $\beta,\beta$ -caroteno
Cantaxantina	$\beta,\beta$ -Caroteno-4,4'-diona
$\alpha$ -Caroteno	(6'R)- $\beta,\epsilon$ -Caroteno
13- <i>cis</i> - $\alpha$ -catoteno	13- <i>cis</i> - $\beta,\epsilon$ -Caroteno
$\beta$ -Caroteno	$\beta,\beta$ -Caroteno
9- <i>cis</i> - $\beta$ -catoteno	9- <i>cis</i> - $\beta,\beta$ -Caroteno
13- <i>cis</i> - $\beta$ -catoteno	13- <i>cis</i> - $\beta,\beta$ -Caroteno
$\gamma$ -Caroteno	$\beta,\psi$ -Caroteno
$\delta$ -Caroteno	(6 R)- $\epsilon,\psi$ -Caroteno
$\zeta$ -Caroteno	7,8,7',8'-Tetraidro- $\psi,\psi$ -caroteno
$\beta$ -Caroteno-5,6-monoepóxido	(5R,6S)-5,6-Epóxi-5,6-diidro- $\beta,\beta$ -caroteno
$\beta$ -Caroteno-5,6:5',6'-diepóxido	5,6:5',6'-Diepóxi-5,6,5',6'-tetraidro- $\beta,\beta$ -caroteno
$\alpha$ -Criptoxantina	(3'R,6'R)- $\beta,\epsilon$ -Caroten-3'-ol
$\beta$ -Criptoxantina (Criptoxantina)	(3R)- $\beta,\beta$ -Caroten-3-ol
3,4-Desidro- $\beta$ -caroteno	3,4-Desidro- $\beta,\beta$ -caroteno

(continua)

## ANEXO I (continuação)

Nome trivial	Nome semi-sistemático
2,2'-Dimetil- $\beta$ -caroteno	2,2'-Dimetil- $\beta,\beta$ -caroteno
Dipalmitato de zeaxantina	(3 R, 3' R) - $\beta,\beta$ -Caroteno-3,3'-diol dipalmitato
Equinenona (Mixoxantina)	$\beta,\beta$ -Caroten-4-ona
Fitoeno (Fitoeno natural)	15- <i>cis</i> -7,8,11,12,7',8',11',12'-Octaidro- $\psi,\psi$ -caroteno
Fitoflueno ( <i>cis</i> -Fitoflueno)	15- <i>cis</i> -7,8,11,12,7',8'-Hexaidro- $\psi,\psi$ -caroteno
Flavoxantina	(3 S, 5 R, 8 R, 3' R, 6' R)-5,8-Epóxi-5,8-diidro- $\beta,\epsilon$ -caroteno-3,3'-diol
Foenicopteron	$\beta,\epsilon$ -Caroten-4-ona
Isocriptoxantina	$\beta,\beta$ -Caroten-4-ol
Isozeaxantina (4,4'-Diidroxib- $\beta$ -caroteno)	$\beta,\beta$ -Carotenona-4,4'-diol
Licopeno	$\psi,\psi$ -Caroteno
Luteína	(3R,3'R,6'R)- $\beta,\epsilon$ -Caroteno-3,3'-diol
Luteoxantina	5,6:5',8'-Diepóxi-5,6,5',8'-tetraidro- $\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diol
5,8-Monoepoxi- $\alpha$ -criptoxantina	5,8-Epóxi-5,8-diidro- $\beta,\epsilon$ -caroten-3'-ol
Mutatocromo ( $\beta$ -caroteno-5,8-furanóxido)	5,8-Epóxi-5,8-diidro- $\beta,\beta$ -caroteno
Mutatoxantina (Citroxantina, zeaxantina furanoxida)	(3S,5R,8RS,3'R)-5,8-Epóxi-5,8-diidro- $\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diol
Neoxantina	(3S,5R,6R,3'S,5'R,6'S)-5',6'-epóxi-6,7-didesidro-5,6,5',6'-tetraidro- $\beta,\beta$ -caroteno-3,5,3'-triol

(continua)

## ANEXO I (continuação)

Nome trivial	Nome semi-sistemático
Neurosporeno	7,8-Diidro- $\psi,\psi$ -caroteno
Nonaprenoxantina	2-(4-Hidróxi-3-metil-2-butenil)- 7',8',11',12'-tetraidro- $\epsilon,\psi$ -caroteno)
Osciloxantina	2,2'-Bis( $\beta$ -L-ramnopiranosilóxi)- 3,4,3',4'-tetradesidro-1,2,1',2'-tetraidro- $\psi,\psi$ -caroteno-1,1'-diol
Semi- $\alpha$ -carotenona	(5,6-Seco- $\beta,\epsilon$ -caroteno-5,6-diona)
Taraxantina (5,6-Monoepoxi-luteína)	(3S,5R,6S,3'R,6'R)-5,6-epóxi-5,6- diidro- $\beta,\epsilon$ -caroteno-3,3'-diol
3,3',4'-Triidroxi- $\alpha$ -caroteno	3,3',4'-Triidróxi- $\beta,\epsilon$ -caroteno
Violaxantina	(3 S, 5 R, 6 S, 3' S, 5' R, 6' S)-5, 6, 5', 6' - Diepóxi - 5, 6, 5',6'- tetraidro - $\beta, \beta$ - caroteno-3,3'-diol
Zeaxantina	(3R,3'R)- $\beta,\beta$ -Caroteno-3,3'-diol
$\alpha$ -Zeacaroteno	7',8'-Diidro- $\epsilon,\psi$ -caroteno
$\beta$ -Zeacaroteno	7',8'-Diidro- $\beta,\psi$ -caroteno
Zeinoxantina	(3 R, 6' R)- $\beta,\epsilon$ -Caroten-3-ol