

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ROSEANA TELLES LINS

**Determinação de tocoferóis e carotenóides em
frutas amazônicas: Implantação de uma
metodologia**

BELÉM

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ROSEANA TELLES LINS

**Determinação de tocoferóis e carotenóides em
frutas amazônicas: Implantação de uma
metodologia**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Pará, para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dra. Luiza Helena Meller da Silva
co-Orientador: Dr. Sylvain Henri Darnet

BELÉM

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ROSEANA TELLES LINS

**Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas:
Implantação de uma metodologia**

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Luiza Helena Meller da Silva
(DEQAL/CT/Orientadora)

Dr. Sylvain Henri Darnet
(DEQAL/CT/co-Orientador)

Dr. Milton Nascimento da Silva
(CCEN/Membro)

Prof Dr. Alberdan Silva Santos
(DEQAL/CT/Membro)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Setorial do Curso de Mestrado em Engenharia Química

Lins, Roseana Telles

Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: implantação de uma metodologia /Roseana Telles Lins; orientadores, Luiza Helena Meller da Silva e Sylvain Henri Darnet._ 2006.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2006

1. Engenharia de alimentos 2. Frutas- Amazônia 3. Polpa de frutas –
Amazônia 4. Carotenóides 5. Vitamina E I. Título

CDD 19 ed. 664.07

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de lutar por esse ideal.

Aos meus pais, familiares e noivo que não pouparam esforços para me compreender e auxiliar nos momentos mais difíceis.

À CAPES, pela bolsa concedida para a realização do curso de Mestrado.

Aos meus orientadores, Professora Luiza Helena Meller da Silva e Professor Sylvain Henri Darnet pelo apoio e orientação.

Às bolsistas Francylla Milhomen e Shirlene Gama, pela ajuda prestada.

Aos técnicos, bolsistas e funcionários dos laboratórios utilizados durante todo o estudo.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que me incentivaram a continuar.

RESUMO

A região Amazônica apresenta uma elevada biodisponibilidade de matérias-primas de origem vegetal, que representam fontes consideráveis em micronutrientes, principalmente vitaminas. O presente trabalho teve por objetivo implantar uma metodologia, no laboratório do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para análise de tocoferóis em polpa de fruta. O método selecionado foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas seguintes condições cromatográficas: detector de fluorescência com excitação a 290 nm e emissão a 230 nm, fluxo 1mL/min, fase metanol: água (95/5 v/v), coluna Gemini C18 fase reversa (250x 4,60 nm 5 μ). A análise de vitamina E foi testada, primeiramente, com o fruto de açai. Dois frutos amazônicos: inajá (*Maximiliana maripa*) e mari (*Poraqueiba paraensis*) tiveram seu perfil em tocoferol analisado. Realizou-se, também, análise de carotenóides em espectrofotometria, considerando o β -caroteno como o carotenóide principal. Os resultados encontrados de concentração destes compostos nas polpas dos frutos de inajá e mari variaram em média entre 135 e 176 μ g/g polpa seca para tocoferol e 113 e 227 μ g/g polpa seca para carotenóides (β -caroteno). Verificou-se que estes frutos podem ser considerados como fontes importantes de vitaminas (E e A), pois suprem as necessidades das recomendações diárias, o que pode proporcionar perspectivas interessantes de valorização das matérias-primas amazônicas para o consumo.

ABSTRACT

Tocopherols and carotenoids are naturally occurring lipophilic micronutrients, suggested to play a role in the prevention of several degenerative diseases. The Amazon region has a high bioavailability of fruits, which represents considerable sources in micronutrientes, mostly vitamins. The aim of this work was the implantation of a methodology for tocopherol determination in two amazon fruits: inaja (*Maximiliana maripa*) and mari (*Poraqueiba paraensis*). The method was described for the determination of vitamin E isomers (α -, β + γ - and δ -tocopherol) in fruits by reversed-phase HPLC with fluorescence detection (excitation to 290 nm and emission to 230 nm), flux 1mL/min., methanol:water phase (95/5 v/v), reverse phase Gemini C18 (250x 4,60 nm 5 μ) column. The global carotenoids analysis of these pulps was realized by espectrofotometria method, considering the β -carotene as standard. The concentrations of vitamin E and carotenoids were, respectively, 135 and 176 μ g/g for dry matter inaja pulp and 113 and 227 μ g/g dry matter mari pulp. These vitamins determinations propose interesting perspectives of valorization of the amazon fruits for the consumption.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fruto do inajá (<i>Maximiliana maripa</i> (Aublet) Drude)	18
FIGURA 2 – Fruto do mari (<i>Poraqueiba paraensis</i> Ducke)	18
FIGURA 3 – Estrutura química de base dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b)	21
FIGURA 4 – Estrutura química do acetado de DL- α -tocoferil	22
FIGURA 5 – Via biossintética dos tocoferóis	24
FIGURA 6 – Estrutura química de compostos pertencentes ao grupo das xantofilas (a) e dos carotenos (b)	28
FIGURA 7 – Procedimentos realizados nas amostras dos frutos de inajá (<i>Maximiliana maripa</i>) e mari (<i>Poraqueiba paraensis</i>)	36
FIGURA 8 – Etapas de determinação do teor de tocoferóis em polpas de frutas, adaptado de Cost (1991)	43
FIGURA 9 – Etapas de determinação quantitativa de carotenóides totais nas polpas de frutas, adaptado de Talcott e Howard (1999)	45
FIGURA 10 – Cromatogramas referentes ao tempo de retenção do α -tocoferol (a), β -tocoferol (b), γ -tocoferol (c) e δ -tocoferol (d)	49
FIGURA 11 – Cromatograma da mistura dos padrões de tocoferol	51
FIGURA 12 – Espectrofotograma da mistura dos padrões de tocoferol (a) e do acetato de α -tocoferil (b)	51
FIGURA 13 – Espectrofotograma do extrato de açaí	54
FIGURA 14 – Cromatogramas do extrato de açaí	55
FIGURA 15 – Cromatogramas do extrato de inajá	58
FIGURA 16 - Cromatogramas do extrato de mari	61
FIGURA 17 – Espectrofotograma do padrão comercial de β -caroteno	65
FIGURA 18 – Curva de calibração do beta-caroteno	65
FIGURA 19 – Média, por lote, do teor em β -caroteno ($\mu\text{g/g}$ matéria seca) das polpas de inajá e mari	66

LISTA DE TABELAS E QUADROS

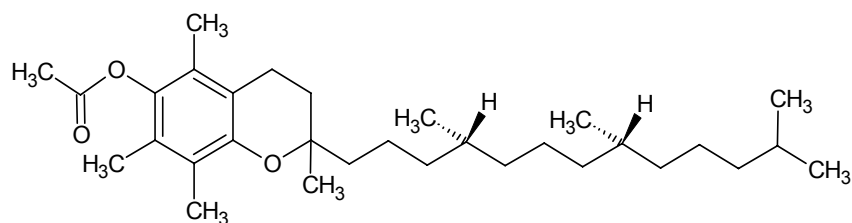
TABELA 1 – Conteúdo de tocoferol em óleos vegetais (mg/Kg)	23
TABELA 2 – Conteúdo de tocoferol (mg/Kg) em produtos de origem animal	23
TABELA 3 – Atividade relativa de pró-vitamina A de alguns carotenóides	30
TABELA 4 – Áreas do Estado do Pará (Brasil) de coleta dos frutos de inajá (<i>Maximiliana maripa</i>) e mari (<i>Poraqueiba paraensis</i>)	35
TABELA 5 – Modelos de regressão linear, obtidos em CLAE, para detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) para os diversos tocoferóis	53
TABELA 6 – Concentrações médias ($\mu\text{g/g}$ m.s.) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de açaí de dois lotes diferentes	56
TABELA 7 – Concentrações médias ($\mu\text{g/g}$ m.s.) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de inajá de três lotes diferentes	59
TABELA 8 – Concentrações médias ($\mu\text{g/g}$ m.s.) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de mari de três lotes diferentes	62
TABELA 9 – Valores médios das concentrações ($\mu\text{g/g}$) das diferentes formas de tocoferol presentes nas polpas de mari	63
TABELA 10 – Caracterização física dos frutos de inajá, distribuídos por lote	67
TABELA 11 – Caracterização físico-química das polpas de inajá, em base seca, distribuídos por lote	68
TABELA 12 – Valor médio da concentração ($\mu\text{g/g}$) em carotenóides presentes nas polpas de inajá	68
TABELA 13 - Caracterização física dos frutos de mari, distribuídos por lote	70
TABELA 14 - Caracterização físico-química das polpas de mari, em base seca, distribuídos por lote	70
TABELA 15 – Valor médio da concentração ($\mu\text{g/g}$) em carotenóides presentes nas polpas de mari	71
QUADRO 1 – Relação dos reagentes e soluções adicionados à amostra e à amostra de referência	41

LISTA DE ABREVIATURAS

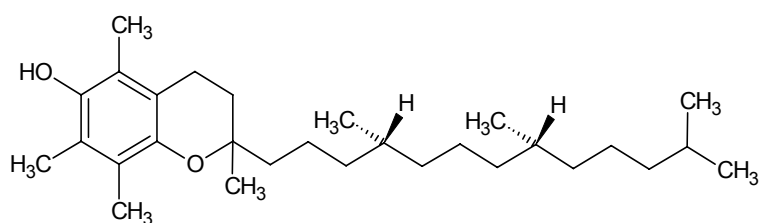
A = unidade de absorbância
Abs = absorbância
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
BHT = 2,6-di-tert-butil-4-metil fenol
DMPBQ = 2,3-dimetil-5-fitilbenzoquinol
 $E^{1\%}$ = coeficiente de absorvidade
ED = detector eletroquímico
FL = detector de fluorescência
GGDP = geranilgeranildifosfato
HGA =homogentísio
HPT = homogentisate preniltransferase
IDR = ingestão diária recomendada
MEP = metileritritol fosfato
MPBQ = 2-metil-6-fitilbenzoquinol
m.s. = matéria seca
MT = 2-metil-6-fitilbenzoquinona metiltransferase
N = nitrogênio
PDP = fitildisfosfato
RE = retinol equivalente
T = tocoferóis
TE = tocoferol equivalente
 T_3 = tocotrienóis
UI = Unidade Internacional
UV = ultravioleta
v ou V = volume
 γ -TMT = γ -tocoferol metiltransferase
 ϕ = diâmetro

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

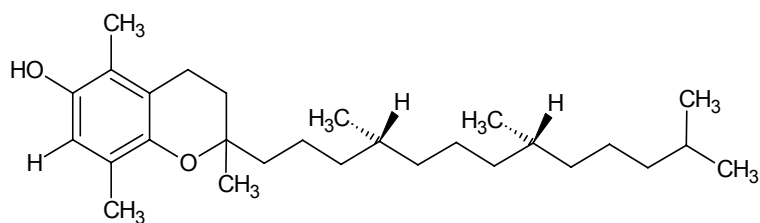
(I) Acetato de dl- α -tocoferil



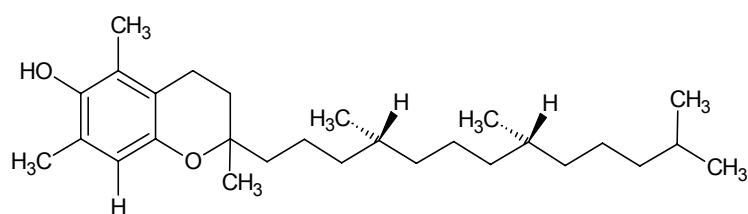
(II) Alfa-tocoferol (α -tocoferol)



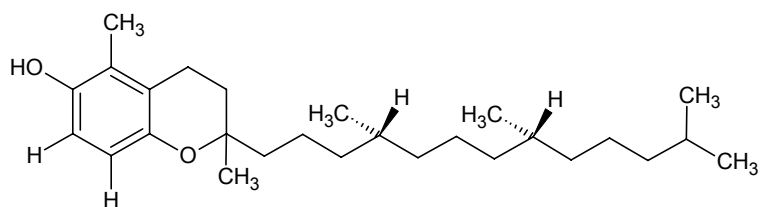
(III) Beta-tocoferol (β -tocoferol)



(IV) Gama-tocoferol (γ -tocoferol)



(V) Delta-tocoferol (δ -tocoferol)



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	125
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 MATÉRIAS-PRIMAS DA AMAZÔNIA	177
2.1.1 Inajá (<i>Maximiliana maripa</i> (Aublet) Drude)	177
2.1.2 Mari (<i>Poraqueiba paraensis</i> Ducke)	188
2.2 NUTRIENTES	199
2.2.1 Vitaminas	199
2.2.1.1 Vitaminas Lipossolúveis	20
a) Vitamina E	20
a.1) Estrutura Química	211
a.2) Fontes Dietéticas	222
a.3) Biossíntese	233
a.4) Funções Fisiológicas	255
a.5) Atividade das Unidades de Vitamina E	266
a.6) Ingestão Diária Recomendada	266
b) Carotenóides	266
b.1) Estrutura Química	277
b.2) Fontes Dietéticas	288
b.3) Biossíntese	299
b.4) Funções Fisiológicas	299
b.5) Atividade dos Carotenóides	3030
b.6) Ingestão Diária Recomendada	311
2.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE COMPOSTOS LIPOSSOLÚVEIS EM ALIMENTOS	311
2.3.1 Vitamina E	311
2.3.1.1 Tratamento da Amostra	322
2.3.1.2 Determinação Analítica	322
2.3.1.3 Detecção	333
2.3.1.4 Quantificação	333
2.3.2 Carotenóides	344
3 MATERIAL E MÉTODOS	355

3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	355
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA.....	366
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	377
3.3.1 Cinzas.....	377
3.3.2 Lipídeos.....	377
3.3.3 Proteína.....	388
3.3.4 Umidade.....	388
3.4 DETERMINAÇÃO DE TOCOFEROL.....	388
3.4.1 Implantação da Metodologia.....	388
3.4.2 Teste da Metodologia.....	388
3.4.3 Protocolo de Determinação de Tocoferol.....	399
3.4.3.1 Reagentes.....	399
3.4.3.2 Procedimento.....	40
a) Preparo das Soluções.....	40
b) Preparo da Amostra.....	4040
c) Saponificação.....	411
d) Extração.....	411
e) Concentração.....	422
f) Separação Cromatográfica.....	422
3.4.3.3 Detecção, Identificação e Quantificação.....	444
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES.....	444
3.5.1 Procedimento.....	444
3.5.2 Preparo da Curva de Calibração do Beta-caroteno.....	455
3.5.3 Detecção e Quantificação.....	466
4. RESULTADOS.....	477
4.1 TOCOFERÓIS.....	477
4.1.1 Escolha da Metodologia.....	47
4.1.2 Condições de Detecção e Separação dos Tocoferóis.....	488
4.1.2.1 Implantação da Metodologia.....	488
4.1.2.2 Detecção dos Tocoferóis em CLAE.....	499
4.1.2.3 Separação dos Tocoferóis em CLAE.....	50
4.1.3 Calibração do Cromatógrafo.....	522
4.1.4 Teste Preliminar da Metodologia.....	544
4.1.5 Análise nos Frutos.....	577
4.1.5.1 Inajá.....	577
4.1.5.2 Mari.....	60
4.2 CAROTENÓIDES.....	64
4.2.1 Determinação de Carotenóides.....	64

4.2.2 Curva de Calibração do β-Caroteno	64
4.2.3 Quantificação de Beta-caroteno nas Frutas	666
4.2.3.1 Inajá.....	67
4.2.3.2 Mari	69
5 CONCLUSÃO	722
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	744
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	755

1 INTRODUÇÃO

A estreita relação entre dieta e saúde vem aumentando a preocupação da população em ingerir alimentos nutritivos e de alta qualidade. Neste sentido, a quantificação de micronutrientes nos alimentos é de grande importância, tanto para o conhecimento do seu valor nutricional quanto para valorizar seus aspectos comerciais.

Um grupo de micronutrientes que vem ganhando destaque pela comunidade científica é o das vitaminas que estão presentes em uma grande variedade de alimentos, principalmente frutas e vegetais.

Muitas pesquisas relacionam uma dieta rica no consumo destes alimentos com a redução de doenças degenerativas como doenças coronárias, câncer e outras condições mediadas pela ação de radicais livres, pois estes alimentos contêm uma grande concentração de compostos que possuem como função fisiológica a ação antioxidante na proteção de organismos vivos contra os danos oxidativos. Entre os compostos que apresentam esta função estão os fenólicos, vitamina C, vitamina E, carotenóides e minerais (BURNS, FRASER e BRAMLEY, 2003).

As espécies amazônicas frutíferas apresentam composições notáveis em micronutrientes, especialmente em vitaminas, sendo valorizadas no contexto atual como alimentos saúde; alimentos naturais ou ainda como produtos éticos ou ecologicamente corretos (MORÓN-VILLARREYES, 1998; VALLILO *et al*, 1999; PALLET, 2002).

Estas espécies representam uma importância para a região com respeito ao uso humano, pois numerosos produtos alimentícios são obtidos, como as frutas; as nozes e os óleos (HAYNES e McLAUGHLIN, 2000).

No entanto, a valorização dos frutos da Amazônia está sujeita às restrições de desenvolvimento da região: uma região que ao mesmo tempo é muito sensível ecologicamente, conta com limitados conhecimentos científicos de apoio e onde as distâncias entre parceiros, fornecedores, clientes e sobretudo mercados implicam em estratégias específicas (PALLET, 2002).

Da mesma forma, o conhecimento dessas espécies e a caracterização de suas propriedades tecnológicas e funcionais em função de sua biodiversidade ainda é um desafio importante para sua valorização, pois um grande número destes frutos não apresenta sua composição química estudada.

Visando preencher esta lacuna e contribuir para o desenvolvimento regional e acadêmico, este trabalho teve como objetivo a implantação de uma metodologia analítica de quantificação de vitamina E (tocoferol) e estimar o teor global de pró-vitamina A (β -caroteno) em polpa de frutas amazônicas, a fim de caracterizar o aspecto nutricional destas frutas o que poderá agregar valor, incentivar a produção em grande escala e aplicá-las na indústria alimentícia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATÉRIAS-PRIMAS DA AMAZÔNIA

A região Amazônica possui uma riqueza considerável em termos de recursos genéticos vegetais, que apresentam potencialidade econômica, e uma perspectiva de valorização importante (CAVALCANTE, 1991; ARAUJO, CARVALHO e ALVES, 2002; PALLET, 2002).

Entre as espécies amazônicas silvestres, os frutos provenientes do extrativismo são os que possuem maior importância para a região, principalmente com respeito ao consumo humano, pois muitos deles apresentam composições apreciáveis em micronutrientes, especialmente em antioxidantes, sendo valorizados no contexto atual como alimentos saúde; alimentos naturais ou ainda como produtos éticos ou ecologicamente corretos (VALLILO *et al*, 1999; HAYNES e McLAUGHLIN, 2000; PALLET, 2002).

Medidas de prevenção de endemias carenciais e incentivo ao desenvolvimento sustentável de matérias-primas regionais levam à busca de dados e subsídios para o real conhecimento de fontes alimentícias com viabilidade econômica (HIANE *et al*, 2003).

Porém, o conhecimento dessas espécies e a caracterização de suas propriedades funcionais, em função de sua biodiversidade, ainda é um desafio importante para sua valorização; pois, segundo Pallet (2002), dados relacionados a estes frutos ainda são escassos.

2.1.1 Inajá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude)

O inajá (Figura 1), pertencente à família Arecaceae (Palmae), é um fruto consumido quase sempre no estado natural, sendo encontrado em toda a Amazônia e países circunvizinhos; tendo sua maior incidência no Estado do Pará e mais precisamente no estuário amazônico, onde parece ter a sua origem, chegando até o Maranhão. Sua frutificação ocorre entre janeiro e março (CAVALCANTE, 1991; SHANLEY, CYMERYS e GALVÃO, 1998).

O fruto é uma drupa ovóide de 5-6 cm de comprimento que apresenta o mesocarpo comestível, seja cru ou cozido, e teor em óleo e proteína de

aproximadamente 37% e 14%, respectivamente (CALZAVARA, SOUZA e CARVALHO, 1978). Segundo Pesce (1941), o fruto seco pesa em média 18g, sendo constituído de epicarpo 16,1%; mesocarpo 26,2% e endocarpo lenhoso 49,2%.



FIGURA 1 – Fruto do inajá.

2.1.2 Mari (*Poraqueiba paraensis* Ducke)

O mari (Figura 2), pertencente a família Icacinaceae, é uma espécie nativa e exclusiva do Pará, comum em todo o estuário até o baixo Amazonas, com frutificação entre os meses de janeiro e junho.

O fruto é uma drupa elipsóideia de 6-8cm de comprimento, possuindo epicarpo fino, amarelo-alaranjado; mesocarpo carnososo-oleoso, cerca de 5 mm de espessura e endocarpo fibroso, delgado, envolvendo uma volumosa semente de 6 cm de comprimento (CAVALCANTE, 1991). Apresenta teor em lipídeos e proteína de aproximadamente 21% e 3%, respectivamente. O epicarpo e o mesocarpo compreendem a parte comestível do fruto (VILLACHICA, 1996).



FIGURA 2 – Fruto do mari.

2.2 NUTRIENTES

Os nutrientes são substâncias químicas, presentes nos alimentos, necessárias ao desenvolvimento e manutenção do organismo vivo. Estas substâncias apresentam funções específicas e funcionam de maneira associada.

Em consequência da sua necessidade de ingestão, os nutrientes são divididos em macronutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) e micronutrientes (vitaminas, minerais, água e fibras). Esta classificação é arbitrária e se baseia no percentual médio com que é recomendado para uma ingestão diária, sem levar em consideração a importância relativa.

O interesse crescente em relação à demanda orgânica de nutrientes, o estabelecimento de padrões nutricionais de ingestão e a preocupação mundial quanto à confiabilidade dos valores destes nutrientes têm ressaltado a necessidade de se determinar a composição química dos micronutrientes em alimentos.

Neste sentido, as vitaminas vêm ganhando destaque pela comunidade científica, pois estão presentes em uma grande variedade de alimentos, principalmente frutas e vegetais.

2.2.1 Vitaminas

Vitaminas são substâncias orgânicas que, embora presentes em pequenas quantidades nos alimentos, principalmente nas frutas, verduras e legumes, são indispensáveis ao funcionamento do organismo, na forma de co-fatores.

Sua ausência sistemática na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e outras perturbações orgânicas, configurando-se um quadro sintomatológico característico de carência (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995).

Independentemente dos fatores do ambiente, a maioria dos organismos animais é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, razão pela qual precisam ser incluídas na dieta; em geral, são necessárias em microquantidades e em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo. As necessidades nutricionais desses micronutrientes aumentam durante os períodos de crescimento, gestação e lactação, nas condições de trabalho intenso e ocorrência de determinadas doenças, principalmente as infecciosas (MURRAY *et al*, 1998).

Tradicionalmente, as vitaminas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis, de acordo com propriedades fisiológicas e físico-químicas comuns (CHAMPE e HARVEY, 1996).

2.2.1.1 Vitaminas Lipossolúveis

As vitaminas lipossolúveis são moléculas apolares e hidrofóbicas, essenciais para o organismo humano, pois são reguladores ativos em vários processos biológicos.

Estas vitaminas são encontradas nos alimentos em associação com os lipídeos, sendo sua absorção dependente destes, ou seja, condições desfavoráveis a um aproveitamento normal destes lipídeos também prejudicam a absorção de tais vitaminas. Não são comumente excretados na urina, tendem a ser armazenadas no organismo em quantidades moderadas e, considerando certas restrições, o homem não é totalmente dependente do seu fornecimento diário na alimentação (BURTON, 1979). A este grupo de compostos estão as vitaminas A, D, E e K.

a) Vitamina E

Foi descoberta nos anos 1920 como um fator lipossolúvel necessário para prevenir a morte fetal e reabsorção em roedores. Quando quimicamente identificada, a vitamina foi chamada tocoferol, do grego tokos (parto) e pherein (suportar).

Esta vitamina possui um papel fundamental no metabolismo normal de todas as células; portanto, sua deficiência pode afetar vários sistemas orgânicos diferentes.

Embora a deficiência de vitamina E em curto prazo na dieta humana não cause nenhuma doença específica, as pesquisas científicas têm mostrado que a vitamina E é essencial tanto para os animais quanto para os humanos.

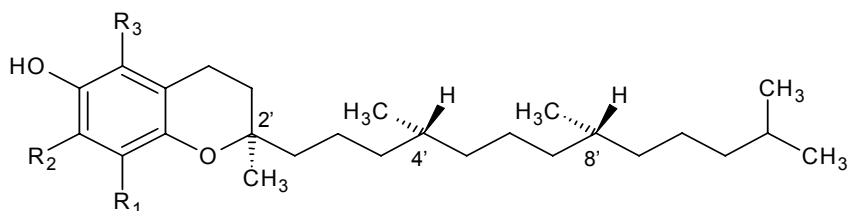
Sua função está relacionada a vários nutrientes e fatores endógenos que, coletivamente, comprometem um sistema que protege contra os efeitos potencialmente prejudiciais das espécies reativas de oxigênio que são formadas metabolicamente ou encontradas no ambiente (COMBS JR, 2002).

O termo vitamina E é o nome genérico aceito pela IUPAC (1982) para designar duas famílias de substâncias biologicamente ativas: os tocoferóis (T) e os

tocotrienóis (T3) que compreendem um grupo de moléculas lipossolúveis que possuem atividades antioxidantes (COLLAKOVA e DELLAPENNA, 2003).

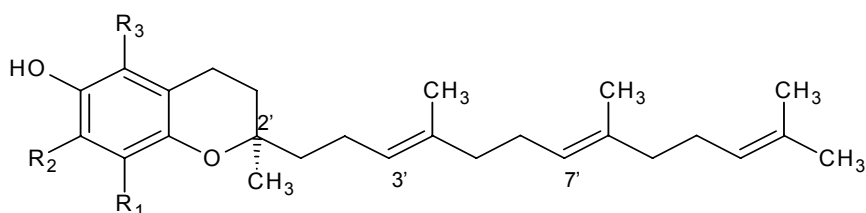
a.1) Estrutura Química

Os tocoferóis e tocotrienóis apresentam como elemento estrutural básico o 2-metil-2(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-cromanol, ligado a uma cadeia lateral alifática que se apresenta saturada e insaturada, respectivamente (NELIS; D'HAESE e VERMIS, 2000). Na Figura 3, estão representadas as estruturas químicas dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b).



(a)

(2R,4'R,8'R)-Tocoferol (T)



(b)

(2R),3'trans,7'trans-Tocotrienol (T3)

ISÔMEROS	R ₁	R ₂	R ₃
(II) Alfa (α)	CH ₃	CH ₃	CH ₃
(III) Beta (β)	CH ₃	H	CH ₃
(IV) Gama (γ)	H	CH ₃	CH ₃
(V) Delta (δ)	H	H	CH ₃

FIGURA 3 – Estrutura química de base dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b).

Em 1964, foi relatado pela primeira vez a existência de quatro compostos naturais que se diferenciam pela localização do grupo metil (CH₃) nas posições 5, 7 e 8 do anel cromanol, designados de: alfa (α-), beta (β-), gama (γ-), e delta (δ-) T/T3.

Na estrutura química dos tocoferóis, há três átomos de carbonos assimétricos nas posições 2, 4' e 8' que lhes permite formar quatro pares de enantiômeros (RRR-SSS; RSR-SRS; RRS-SSR; RSS-SRR) para cada molécula de tocoferol (CUVELIER, DOTREPPE e ISTASSE, 2003).

O α -tocoferol natural, a forma de tocoferol mais encontrada na natureza, apresenta-se com a configuração 2R,4'R,8'R e é denominado de D- α tocoferol ou RRR- α tocoferol. Os tocotrienóis, no entanto, são encontrados naturalmente, em maior quantidade, com a configuração 2R-trans/trans (PENNOCK, HEMMING e KERR, 1964).

As formas sintéticas do α -tocoferol são obtidas pela esterificação do grupo hidroxil do anel cromanol com acetato, nicotinato, succinato ou fosfato. Em sistema ácido-aquoso, o tocoferol é liberado por hidrólise do acetato de tocoferil. As moléculas esterificadas são a formas estável de α -tocoferol e são estáveis a oxidação; porém, não atuam como antioxidantes porque a atividade do grupo hidroxil não é ativa (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000). Na Figura 4, pode-se visualizar a estrutura química do acetato de dl- α -tocoferil.

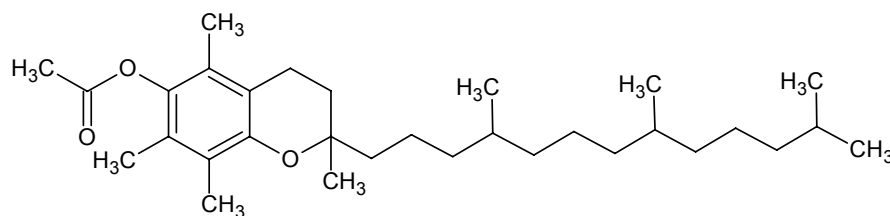


FIGURA 4 – Estrutura química do acetado de dl- α -tocoferil.

a.2) Fontes Dietéticas

A vitamina E é encontrada principalmente em produtos de origem vegetal, que apresentam alto teor em gordura, como amêndoas, óleos vegetais, frutas e vegetais. Cada produto contém diferentes quantidades de vitamina E, com proporções de tocoferol e tocotrienol muito variáveis.

Algumas das fontes ricas em vitamina E são: gérmen de trigo, milho, semente de girassol, canola, óleo de soja e vegetais folhosos. As Tabelas 1 e 2, apresentam o conteúdo de tocoferóis em alguns óleos vegetais e alimentos de origem animal, respectivamente.

TABELA 1 – Conteúdo, aproximado, de tocoferol em óleos vegetais (mg/Kg).

ÓLEO	TOCOFERÓIS				TOCOTRIENÓIS			
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ
Coco	5-10	---	5	5	5	traço	1-20	---
Oliva	1-240	0	0	0	---	---	---	---
Palma	180-260	traço	320	70	120-150	20-40	260-300	70
Soja	30-120	0-20	250-930	50-450	0	0	0	---
Girassol	350-700	20-40	10-50	1-10	---	---	---	---

FONTE: MADHAVI; DESHPANDE e SALUNKHE, 1995.

TABELA 2 – Conteúdo, aproximado, de tocoferol (mg/Kg) em produtos de origem animal.

PRODUTO	α -TOCOFEROL (mg/Kg)
Carne	6
Frango	4
Porco	5
Camarão	7
Leite (primavera)	0,2
Leite (outono)	1,1
Manteiga	10 - 33
Ovos	5 - 11

FONTE: MADHAVI, DESHPANDE e SALUNKHE, 1995.

a.3) Biossíntese

Os tocoferóis, embora desempenhem funções biológicas importantes nos animais e nos seres humanos, são sintetizados apenas pelos organismos fotossintéticos (plantas verdes e algumas cianobactérias) e algumas plantas não fotossintéticas, como os cogumelos (THRELFALL, 1971; SATTLER, CHENG e DELLAPENNA, 2004).

A biossíntese dos tocoferóis, segundo Hirschberg (1999), é realizada por precursores derivados de duas vias. A via do metileritritol fosfato (MEP) que origina a cadeia lateral através da síntese do fitildisfosfato (PDP) (BRAMLEY *et al*, 2000); e a via chiquimato que produz o ácido homogentísio (HGA), o qual contribui para a

formação do anel aromático da estrutura do tocoferol. A Figura 5 esquematiza a biosíntese dos tocoferóis.

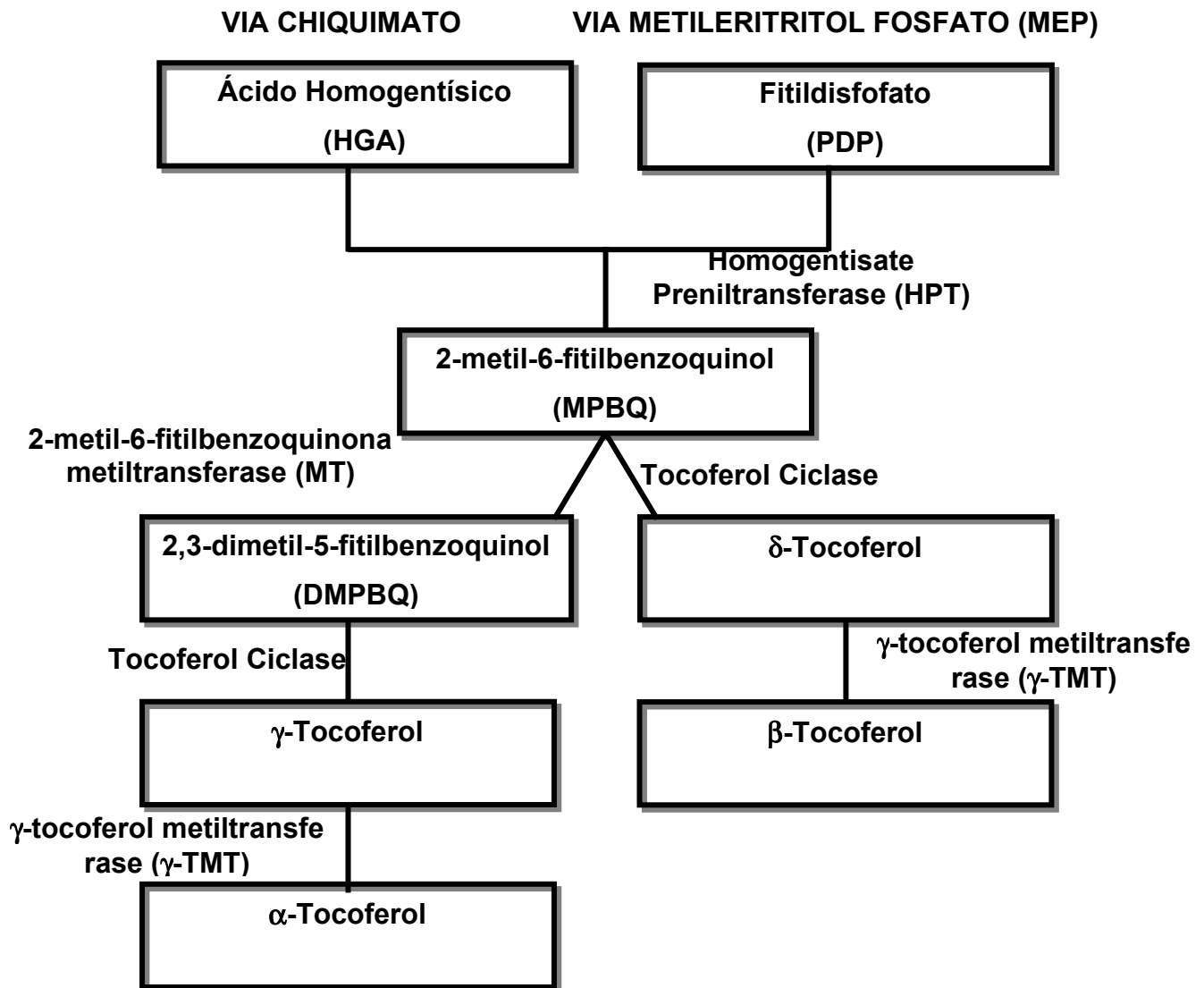


FIGURA 5 – Via biossintética dos tocoferóis.

O início da via de biossíntese dos tocoferóis, segundo Janiszowska e Pennock (1976) é a prenilação do HGA com o PDP para formação do 2-metil-6-fetilbenzoquinol (MPBQ) através da ação da homogentisate preniltransferase (HPT).

Em seguida, o MPBQ sofre ação de duas enzimas distintas: 2-metil-6-fetilbenzoquinona metiltransferase (MT) que origina o 2,3-dimetil-5-fetilbenzoquinol (DMPBQ), devido a uma metilação na posição R2 do anel cromanol, e a tocoferol ciclase que dá origem ao δ-tocoferol. O composto DMPBQ, por sua vez, sofre ação da tocoferol ciclase e origina o γ-tocoferol.

Os compostos γ - e δ -tocoferol, então, são induzidos pela γ -tocoferol metiltransferase (γ -TMT) a sofrerem uma metilação na posição R3 do seu anel cromanol, convertendo-os a α - e β -tocoferol, respectivamente.

O α -tocoferol é a forma encontrada em maior quantidade nos tecidos fotossintetizantes, enquanto que nos tecidos não fotossintetizantes e nas sementes, por outras vias intermediárias, podem acumular níveis significantes de β -, γ -, δ -tocoferol (SATTler, CHENG e DELLAPENNA, 2004).

A biossíntese dos tocotrienóis, segundo Janiszowska e Pennock (1976), acontece quando o HGA (precursor do anel aromático) se condensa com o geranilgeranildifosfato (GGDP) que substitui o fitildifosfato como precursor da cadeia lateral da molécula.

a.4) Funções Fisiológicas

Apesar de muitas especulações sobre a função celular da vitamina E, as evidências sugerem que sua atividade biológica seja consequência de suas propriedades antioxidantes, tanto na proteção das plantas quanto dos animais contra a fotootoxidação. Nas plantas verdes, o processo fotossintético produz grandes quantidades de radicais livres gerados do uso de oxigênio singlete (GABY e SINGH, 1991).

No sistema animal, a vitamina E (α -tocoferol) representa o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares, atuando na proteção contra a lipoperoxidação, ou seja, evitando a formação de radicais peróxidos a partir de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas fosfolipídicas, convertendo-os em produtos mais estáveis (KAY *et al*, 1986). Pode, ainda, reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o superóxido, a hidroxila, e também com o oxigênio singlete, evitando desta forma, possíveis danos celulares (MACHLIN e BENDICH, 1987).

Em consequência disto, o consumo de tocoferol tem importante papel no melhoramento da função imune e na limitação de incidências e progressão de muitas doenças degenerativas incluindo certos tipos de câncer, catarata, desordens neurológicas e doenças cardiovasculares (BRIGELIUS-FLOHE e TRABER, 1999; BRAMLEY *et al*, 2000; PRYOR, 2000).

a.5) Atividade das Unidades de Vitamina E

O valor nutricional da vitamina E na dieta humana foi reconhecido por Evans e Bishop em 1922, sendo a atividade biológica desta vitamina, nos animais, definida por sua influência nos sintomas da sua deficiência, incluindo neuropatia, morte fetal ou miopatia (doença muscular).

O conteúdo de vitamina E é geralmente expresso pela sua atividade biológica, usando a escala de Unidade Internacional (UI). Neste sistema, a atividade biológica de 1 mg de d- α -tocoferol é equivalente à 1,49 UI de vitamina E e de 1 mg de acetato de dl- α -tocoferil é equivalente à 1 UI. Até 1980, a ingestão diária recomendada (IDR) para vitamina E era expressa em UI; e a partir de então, o termo tocoferol equivalente (TE) foi usado para expressar a IDR, sendo que 1 mg de d- α -tocoferol é equivalente à 1 TE (RUPÉREZ *et al*, 2001).

Todas as formas da vitamina E apresentam atividades biológicas, expressos em tocoferol equivalente, definidos como: α -tocoferol, mg x 1 TE; β -tocoferol, mg x 0,5 TE; γ -tocoferol, mg x 0,1 TE; δ -tocoferol, mg x 0,03 TE; α -tocotrienol, mg x 0,3 TE e β -tocotrienol, mg x 0,05 TE. As atividades biológicas do γ - e δ -tocotrienol foram abaixo do nível de detecção (NRC, 1989).

a.6) Ingestão Diária Recomendada

Em consequência dos animais e dos humanos serem incapazes de biossintetizar vitamina E, eles têm que suprir suas necessidades através da dieta, principalmente pelo consumo de produtos de origem vegetal (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000).

O Instituto Nacional de Saúde (INH) sugere uma IDR de 15 a 19 mg de α -tocoferol ou de 22 a 28 IU para os humanos.

b) Carotenóides

Os carotenóides são compostos lipossolúveis, poliisoprenóides que formam um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais encontrados na natureza. Apresentam uma grande distribuição e diversidade estrutural, além de inúmeras funções (SANDERS, 1994; OLIVER e PALOU, 2000).

Cerca de mil carotenóides naturais já foram identificados; porém, aproximadamente 10% pode ser encontrado na dieta humana e cerca de 20% deles no plasma e tecidos de mamíferos. Os principais carotenóides são beta (β -) e alfa (α -) caroteno, licopeno, luteína e beta-criptoxantina que contribuem com 90% dos carotenóides circulantes em humanos, desempenhando atividade de pró-vitamina A, importante atividade nutricional dos carotenóides no organismo humano (ROCK, 1997).

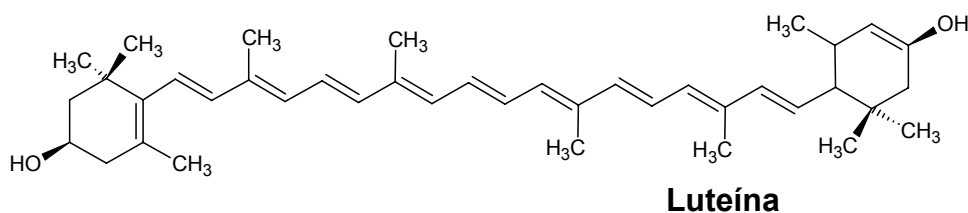
b.1) Estrutura Química

Os carotenóides são substâncias lipofílicas e insolúveis em meio aquoso. Estruturalmente são poliisoprenóides, possuindo cerca de quarenta átomos de carbono, podendo ser acíclicos ou conter um anel com cinco ou seis átomos de carbono em uma ou em ambas as extremidades da cadeia.

A presença de um grande número de ligações duplas conjugadas na cadeia hidrocarbônica das moléculas de carotenóides é responsável por uma das mais específicas características dos carotenóides: absorção da luz que, conseqüentemente, inativa o oxigênio singlete e radicais livres. A presença destas ligações conjugadas possibilita uma variedade de isômeros geométricos (cis/trans), sendo a forma trans a naturalmente encontrada na maioria dos carotenóides (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ e PÉREZ-GÁLVEZ, 2002).

Os carotenóides podem ser divididos em dois grandes grupos, das xantofilas (oxicarotenóides) ou dos carotenos (hidrocarotenóides), considerando-se a presença ou não do oxigênio em sua estrutura, respectivamente (THANE e REDDY, 1997; OLIVER e PALOU, 2000). Na figura 6, estão apresentadas as estruturas de compostos pertencentes a estes grupos.

(a)



(b)

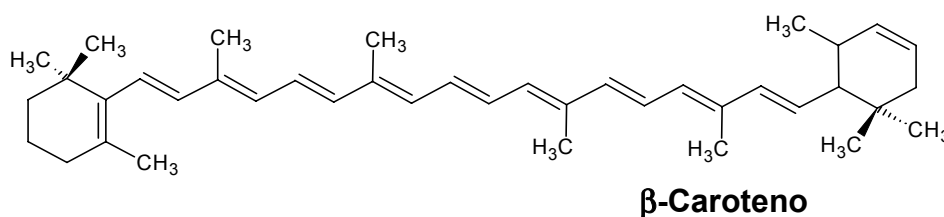


FIGURA 6 – Estrutura química de compostos pertencentes ao grupo das xantofilas (a) e dos carotenos (b).

b.2) Fontes Dietéticas

Embora as principais fontes dos carotenóides sejam as plantas, eles são também encontrados nos microrganismos e nos animais, sendo armazenados em diferentes tecidos (OLIVER e PALOU, 2000).

As fontes dietéticas importantes neste nutriente são frutas e vegetais verdes escuros, amarelos, alaranjados ou vermelhos. As frutas amazônicas, como tucumã (*Astrocaryum aculeatum*); pupunha (*Bactris gasipaes*); buriti (*Mauritia flexuosa*); uxi (*Endopleura uchi*); mari (*Poraqueiba paraensis*); entre outras, são consideradas fontes importantes de carotenóides; pois, contêm um alto potencial deste nutriente na forma de beta-caroteno, sendo indicadas para o enriquecimento da dieta (AGUIAR *et al*, 1980; BENTES *et al*, 1981; ARRUDA, BENTES e SERRUYA, 1982; ARRUDA *et al*, 1983).

No entanto, o conteúdo de carotenóide nos frutos depende da espécie, variedade, safra e grau de maturação (OLIVER, PALOU e PONS, 1998). A distribuição destes compostos também apresenta variações consideráveis, sendo geralmente mais concentrados na película do que na polpa de alguns frutos (LIMA, MÉLO e LIMA, 2002).

b.3) Biossíntese

Os carotenóides são amplamente encontrados na natureza, sendo sintetizados pelas plantas. O organismo humano não possui a capacidade de sintetizar estes compostos que devem, então, ser obtidos de fontes dietéticas como frutas e vegetais (SANDERS, 1994; OLIVER, PALOU e PONS, 1998).

Muitos dos carotenóides encontrados naturalmente nas frutas e vegetais apresentam uma cadeia carbônica composta por quarenta átomos de carbono que são biossintetizados a partir de duas moléculas, intermediárias, contendo vinte átomos de carbono (geranilgeranil difosfato); originando a molécula do fitoene o qual é precursor genérico de muitos carotenóides presentes no reino plantae (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ e PÉREZ-GÁLVEZ, 2000).

A molécula de fitoene, no entanto, sofre uma série de sucessivas dessaturações, introduzindo novas ligações duplas conjugadas na cadeia carbônica, resultando, deste modo, o cromóforo que é típico destes pigmentos naturais e é responsável por suas propriedades cromáticas.

As sucessivas mudanças estruturais, como a ciclização e outras modificações a partir de hidrogenação, dehidrogenação, migração das duplas ligações, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjos, isomerização, introdução de funções oxigênio ou a combinação destes processos produzem uma elevada quantidade de estruturas de carotenóides encontrados na natureza (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ e PÉREZ-GÁLVEZ, 2000).

b.4) Funções Fisiológicas

Os carotenóides, em consequência da sua estrutura conjugada de polieno, desempenham funções essenciais como pigmentos acessórios na fotossíntese e na proteção de plantas e microorganismos contra os processos fotooxidativos (ROCK, 1997; OLIVER, PALOU e PONS, 1998).

Embora os carotenóides não sejam nutricionalmente essenciais, eles desempenham um papel importante na dieta humana; pois uma de suas funções é atuar como precursor da vitamina A no organismo humano (THANE e REDDY, 1997).

Várias pesquisas indicam que a atividade da pró-vitamina A de alguns carotenóides tem aplicações importantes tanto na prevenção de certas doenças;

devido as suas funções biológicas, como estimulação da resposta imune em diferentes níveis e ação antioxidante (OLIVER e PALOU, 2000; CAMPOS *et al*, 2003).

b.5) Atividade dos Carotenóides

Nutricionalmente, a principal função fisiológica dos carotenóides é a sua capacidade como precursor da vitamina A, o que lhes confere um valor de pró-vitamina A.

O β -caroteno é o carotenóide que apresenta uma maior atividade potencial de pró-vitamina A quando comparado aos outros, pois é capaz de originar, a partir da ruptura enzimática de sua estrutura, duas moléculas de vitamina A. No entanto, ensaios *in vitro* realizados em 1967 pela FAO/WHO, mostraram que apenas metade da molécula do β -caroteno é convertido em retinol e um terço do carotenóide é absorvido no intestino; desta forma, um sexto do β -caroteno ingerido é metabolicamente ativo como vitamina A (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ e PÉREZ-GÁLVEZ, 2002).

Assim, o termo retinol equivalente (RE) foi introduzido para expressar o conteúdo de vitamina A nos alimentos, onde um retinol equivalente corresponde a $6\mu\text{g}$ de β -caroteno ($1\text{RE} = 6\mu\text{g}$ β -caroteno). Na Tabela 3, estão apresentados as atividades relativas de pró-vitamina A de alguns carotenóides.

TABELA 3 – Atividade relativa de pró-vitamina A de alguns carotenóides.

CAROTENÓIDES	ATIVIDADE (%)
All-trans- β -caroteno	100
All-trans-criptoxantina	57
All-trans- α -caroteno	53
γ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno	20-40

FONTE: ZECHMEISTER, 1949; BAUERNFEIND, 1972.

b.6) Ingestão Diária Recomendada

A ingestão diária recomendada (IDR) para vitamina A é de 700 RE para as mulheres e de 900 RE para os homens, segundo a Food and Nutrition Board (2001).

2.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE COMPOSTOS LIPOSSOLÚVEIS EM ALIMENTOS

O método de extração de vitaminas em alimentos compreende técnicas analíticas dispendiosas e de longo tempo de análise (RUPÉREZ, 2001). Tradicionalmente, a análise de vitaminas lipossolúveis é conduzida por saponificação alcalina da matriz alimentar ou de uma fração lipídica isolada, com o objetivo de romper a matriz e degradar triacilgliceróis a glicerol e produzir material saponificável a partir dos ácidos graxos livres, seguida de uma extração líquida com solventes orgânicos como éter dietílico ou n-hexano (BRUNI *et al*, 2002; RODAS MENDOZA *et al*, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido o método analítico usado de maior referência na literatura, acoplado a um detector de fluorescência e/ou de ultravioleta (SÁNCHEZ-MACHADO, LÓPEZ-HERNÁNDEZ e PASEIRO-LOSADA, 2002).

2.3.1 Vitamina E

A determinação de vitamina E nos alimentos tem duas finalidades: avaliação nutricional e controle de qualidade. O aspecto de qualidade se relaciona à identidade e a estabilidade antioxidante do produto alimentar; pois, a presença do conteúdo das várias isoformas da vitamina E reflete no potencial antioxidante dos alimentos (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000).

Como os oito compostos de vitamina E apresentam estruturas químicas muito semelhantes, as separações cromatográficas e o isolamento dos componentes de tocoferol individualmente têm sido os interesses de muitos pesquisadores na área de alimentos; pois estes compostos têm diferentes atividades biológicas e antioxidantes, sendo necessária a obtenção de dados quantitativos de cada substância separadamente (CARLUCCI *et al*, 2001).

2.3.1.1 Tratamento da Amostra

O tratamento de amostras para análise de vitamina E freqüentemente inclui etapa de saponificação que é representada por aquecimento com hidróxido de potássio (KOH), em etanol ou metanol. Para evitar a oxidação das vitaminas lipossolúveis nesta etapa, alguns pesquisadores recomendam a adição de antioxidantes, como 2,6-di-tert-butil-4-metil fenol (BHT), ácido ascórbico, pirogallol, de forma combinada ou não (RUPÉREZ, 2001).

Após a saponificação, os componentes insaponificáveis como a vitamina E são extraídos com adição de solventes orgânicos; enquanto que, os sais de ácidos graxos, o glicerol e outros compostos interferentes permanecem na fase aquosa alcalina.

2.3.1.2 Determinação Analítica

Uma variedade de métodos tem sido descritos para a determinação analítica dos isômeros e homólogos de vitamina E. Separações realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal ou reversa, utilizando detectores de ultravioleta e/ou fluorescência, têm sido largamente utilizadas. Esta técnica é normalmente utilizada na separação de constituintes não voláteis e de alto peso molecular (SALO-VAANANEN *et al*, 2000).

Os tocoferóis e tocotrienóis apresentam propriedades físico-químicas peculiares que fazem deles compostos apropriados para serem separados e quantificados por cromatografia líquida; pois, são apolares, não voláteis, e facilmente detectáveis por suas características UV, fluorescente e eletroquímica (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000).

As colunas analíticas para CLAE mais utilizadas para a determinação de vitaminas são de dois tipos: as de fase normal e as de fase reversa. As de fase normal são polares (sílica e outros), produzem separação em fases móveis extremamente apolares e promovem a separação de todos os tocoferóis (TURNER e MATHIASSEN, 2000); enquanto as de fase reversa são revestidas em grau variável (de 6 a 18%) com polímeros apolares, octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), que propiciam melhor resposta com fases móveis polares (SNYDER; KIRKLAND e GLAJCH, 1997). Porém, nesta fase, ao contrário da fase normal, não há separação completa do β - e do γ -tocoferol e tocotrienol.

Embora os isômeros β -, e γ -tocoferol e tocotrienol não sejam separados pela coluna C18 usando uma fase móvel polar (acetonitrila ou metanol-água), esta técnica pode ser aplicada para análise de lipídeos antioxidantes nos casos onde um dos componentes do par isomérico esteja ausente na amostra e/ou não seja de fundamental importância a separação dos isômeros na pesquisa realizada. Os produtos de origem animal e vegetal, contém na sua composição, principalmente, α - e γ -tocoferol (CERT, MOREDA e PÉREZ-CAMINO, 2000).

Algumas vantagens práticas quanto ao uso desta técnica está relacionado ao fácil equilíbrio da fase móvel, reprodutibilidade dos picos cromatográficos característicos, compatibilidade com grande sensibilidade eletroquímica de detecção, baixa volatilidade dos solventes usados na fase móvel e boa seletividade para os isômeros geométricos dos tocotrienóis (ABIDI, 2000).

2.3.1.3 Detecção

Existem vários detectores que podem ser usados junto ao CLAE, como: detector de absorbância ultravioleta (UV), detector de fluorescência (FL), e detector eletroquímico (ABIDI, 2000).

Para a determinação de vitamina E, o detector de fluorescência é geralmente utilizado devido a sua elevada sensibilidade e especificidade quando comparado ao detector de ultravioleta, pois os tocoferóis são compostos que apresentam propriedades fluorescentes (KAMAL-ELDIN *et al*, 2000; PANFILI, FRATIANNI e IRANO, 2003).

O acetato de α -tocoferol não apresenta retenção em sistemas de fase normal e não é fluorescente nem eletroquimicamente ativo, sendo necessária a utilização do detector de absorção UV para sua detecção nos sistemas de fase reversa.

2.3.1.4 Quantificação

Para quantificar as formas de vitamina E em CLAE, tanto a padronização externa quanto a interna pode ser considerada.

Para a utilização do padrão externo, usam-se concentrações conhecidas de soluções de padrões comerciais. As curvas de calibração são construídas plotando alturas do pico ou suas áreas absolutas contra as concentrações correspondentes. Consequentemente, a padronização externa pode dar boa precisão, prevenindo as flutuações e perdas associadas com a amostra (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000).

Quanto a padronização interna, a substância mais freqüentemente usada como padrão interno do α -tocoferol é o acetato de α -tocoferil que difere do α -tocoferol quanto a presença de uma esterificação no anel cromanol.

2.3.2 Carotenóides

A determinação de carotenóides nos alimentos pode ser realizada tanto de forma global, determinando-se apenas de forma quantitativa os compostos presentes na matriz alimentar, quanto de forma que se possam identificar quais os carotenóides que se fazem presentes na amostra.

A forma global de identificação dos carotenóides baseia-se na determinação espectrofotométrica da amostra, fazendo-se leitura da absorbância do extrato obtido na etapa de extração a um comprimento de onda de máxima absorção do requerido composto, para em seguida calcular-se a sua concentração.

A identificação das xantofilas e carotenos é realizada através da separação destes compostos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fazendo uso de métodos em fase normal ou reversa, utilizando detectores de ultravioleta, por arranjo de fotodiodos, eletroquímico (ED) ou espectrometria de massas (FERRUZZI *et al*, 1998; HUCK *et al*, 2000; ROZZI *et al*, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Amostras dos frutos de inajá (*Maximiliana maripa*) e mari (*Poraqueiba paraensis*) utilizadas neste estudo foram adquiridas durante o seu período de safra do ano de 2005, de diversas localidades do Estado do Pará (Brasil). As amostras foram distribuídas em lotes de acordo com sua procedência, conforme apresentado na Tabela 4.

TABELA 4 – Áreas do Estado do Pará (Brasil) de coleta dos frutos de inajá (*Maximiliana maripa*) e mari (*Poraqueiba paraensis*).

FRUTOS	AMOSTRAS	LOCALIDADES	IDENTIFICAÇÃO*
INAJÁ** (<i>Maximiliana maripa</i>)	Lote 1 (5 Kg; ± 170 frutos)	Abaetetuba-PA	Inajá-P1
	Lote 2 (5 Kg; ± 170 frutos)	Abaetetuba-PA	Inajá-P2
	Lote 3 (5 Kg; ± 170 frutos)	Abaetetuba-PA	Inajá-P3
MARI (<i>Poraqueiba paraensis</i>)	Lote 1 (5 Kg; ± 100 frutos)	Belém-PA	Mari-P1
	Lote 2 (5 Kg; ± 100 frutos)	Guajará-PA	Mari-P2
	Lote 3 (5 Kg; ± 100 frutos)	Ilha das Onças-PA	Mari-P3

* Codificação utilizada no estudo. ** Amostras de mesma região, porém de áreas distantes de 2Km.

Os frutos de inajá, embora tenham sido adquiridos apenas do município de Abaetetuba-PA são de áreas diferenciadas.

As amostras foram levadas para o Laboratório de Análises da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foi realizada caracterização física, despulpamento e caracterização físico-química dos frutos.

A Figura 7 apresenta as etapas pelas quais as amostras dos frutos passaram, desde a sua coleta até o momento de realização das análises.

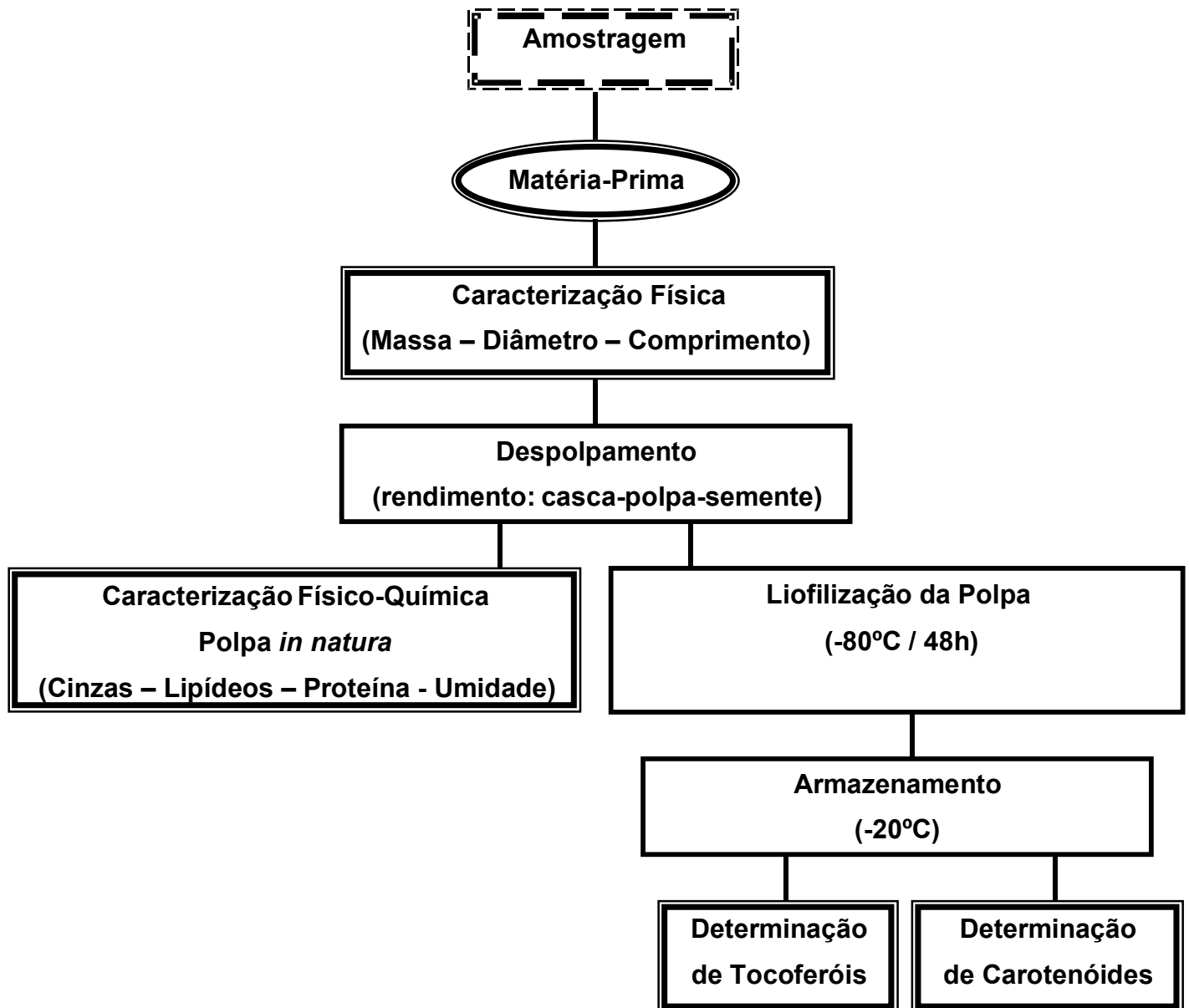


FIGURA 7 – Procedimentos realizados nas amostras dos frutos de inajá (*Maximiliana maripa*) e mari (*Poraqueiba paraensis*).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

A caracterização física dos frutos foi realizada em cada lote a partir de amostras selecionadas aleatoriamente. Por apresentarem grau de maturação, forma e tamanho homogêneos foram selecionados 30 frutos de cada lote e realizada a caracterização (massa, comprimento e diâmetro), utilizando-se balança eletrônica semi-analítica (BG 4400 Gehaka) e paquímetro (MAUb stainless).

Em seguida, os frutos foram despulpados manualmente e realizou-se a medida de massa de cada parte individualmente em balança semi-analítica para obter-se o seu rendimento em relação ao fruto como um todo. Posteriormente, parte da polpa foi levada à análise físico-química e o restante foi armazenado em bandejas de alumínio a -20°C, por no mínimo 24 horas, para ser submetido ao processo de liofilização por 48 horas à -80°C (liofilizador Virtis, Bench Top 6K).

Após saída do liofilizador, as polpas foram acondicionadas em embalagens de polietileno, identificadas e embaladas a vácuo. As amostras embaladas foram protegidas da luz com uso de papel alumínio e acondicionadas -20°C até o momento de serem realizadas as análises de determinação de tocoferóis e carotenóides totais.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química foi realizada nas polpas *in natura* das frutas de acordo com os métodos oficiais de análises de frutas (AOAC, 1997; AOCS, 2002). As análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Análises da Universidade Federal do Pará (UFPA), conforme descrito.

3.3.1 Cinzas

A determinação das cinzas foi realizada em mufla a 550°C, segundo o método AOAC 940.26 (AOAC, 1997).

3.3.2 Lipídeos

Os lipídeos foram extraídos e quantificados de acordo com o método AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2002), expresso em porcentagem; utilizando-se o equipamento de soxhelet. Este método permite a extração de substâncias lipossolúveis com éter de petróleo como solvente.

3.3.3 Proteína

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método AOAC 920.152, método Kjeldahl (AOAC, 1997).

3.3.4 Umidade

O método determina umidade e materiais (substâncias) voláteis, expressos em porcentagem a partir da perda de massa da amostra. Para a determinação do teor de umidade, foi utilizado o método AOAC 931.04 (AOAC, 1997).

3.4 DETERMINAÇÃO DE TOCOFEROL

3.4.1 Implantação da Metodologia

A separação, identificação e quantificação da vitamina E, em tocoferóis, presente nas polpas liofilizadas dos frutos em estudo, foi realizado segundo protocolo descrito por Debier *et al* (1999), adaptado de Cost (1991), seguido de algumas modificações.

O procedimento do método é descrito para a determinação de tocoferóis em amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); partindo-se do princípio de que o óleo, ou a gordura, ou o material não saponificável, é dissolvido em um solvente orgânico e submetido à separação dos tocoferóis em CLAE. A concentração em tocoferóis contidos na amostra foi expressa em $\mu\text{g/g}$ de polpa liofilizada.

Para a implantação da metodologia algumas condições cromatográficas foram testadas, como vazão e concentração da fase móvel; assim como o tempo de análise.

3.4.2 Teste da Metodologia

Para a certificação de repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia proposta, realizou-se um teste preliminar com o açaí, fruto regional, por este já apresentar o seu perfil em tocoferol publicado na literatura.

3.4.3 Protocolo de Determinação de Tocoferol

3.4.3.1 Reagentes

Os reagentes e produtos químicos utilizados nesta etapa do estudo foram todos grau cromatográfico ou de alta pureza, conforme descrito.

- ❖ Acetato de dl-alfa-tocoferil, $\geq 97\%$ – Ref. 95250 – Biochemika.
- ❖ Etanol 96%, extra puro – Ref. 1.00971 – Merck; Darmstadt, Germany.
- ❖ Etanol absoluto grau cromatográfico – Ref. 1.11727 – Merck; Darmstadt, Germany.
- ❖ Éter dietílico estabilizado com 5-10 ppm de BHT – Ref. 1.00921 – Merck; Darmstadt, Germany.
- ❖ Fenoltaleína, pó – Ref. 2870-04 – J.T. Baker, México, México.
- ❖ Hidroquinona, 99% – Ref. 120915000 – Acros Organics, New Jersey, USA.
- ❖ Hidróxido de potássio, pellets – Ref. 3140-19 – J.T. Baker, México, México.
- ❖ Metanol, solvente CLAE – Ref. 9093-68 – J.T. Baker, USA.
- ❖ Metanol, solvente CLAE – Ref. 1.06007 – Lichrosolv – Merck; Darmstadt, Germany.
- ❖ Nitrogênio sem oxigênio 99,9%
- ❖ Óleo de coco livre de vitamina E (exceção)
- ❖ Padrão α -tocoferol – Ref. 1072 – Matreya, Inc.
- ❖ Padrão β -tocoferol – Ref. 1071 – Matreya, Inc.
- ❖ Padrão γ -tocoferol – Ref. 1073 – Matreya, Inc.
- ❖ Padrão δ -tocoferol – Ref. 1790 – Matreya, Inc.
- ❖ Sulfito de sódio nono hidratado – Ref. 1313-84-4 – Sigma, Steinheim, Germany.

3.4.3.2 Procedimento

a) Preparo das Soluções

❖ Solução de hidróxido de potássio – KOH: Dissolveu-se 50g de hidróxido de potássio em 100 mL de água ultra pura.

❖ Solução de sulfeto de sódio nono hidratado - $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: Dissolveu-se 12,2448g de sulfeto de sódio nona hidratado em 100 mL de água ultra pura.

❖ Solução de fenolftaleína: Dissolveu-se 2g de fenolftaleína em 100 mL de etanol absoluto P.A.

❖ Solução de acetato de dl- α -tocoferil: Aqueceu-se à 60°C por aproximadamente uma hora o acetato, em banho-maria. Pesou-se aproximadamente 70 mg (0,07g) deste produto e diluiu-se em 100 mL de etanol grau cromatográfico originando a solução A1. Agitou-se por aproximadamente duas horas. Retirou-se 5 mL, da solução A1, e diluiu-se novamente para 100 mL de etanol, originando a solução A2. Fez-se a leitura em espectrofotômetro UV à 284nm, para verificação da aferição da concentração. As soluções A1 e A2 têm validade máxima de uma semana quando armazenadas a -20°C.

❖ Solução saturada de éter dietílico em água: Misturou-se 100 mL de éter dietílico com 900 mL de água ultra pura.

b) Preparo da Amostra

Foi tomada a massa de 1g de polpa, liofilizada e triturada, em balão de fundo chato de 250 mL. Para a amostra de referência, pipetou-se 0,5 mL de acetato (solução A2), em balão de fundo chato de 250 mL. No Quadro 1, estão apresentados os reagentes e quantidades adicionados à amostra e à amostra de referência.

QUADRO 1 – Relação dos reagentes e quantidades adicionados à amostra e à amostra de referência.

AMOSTRA DE REFERÊNCIA	AMOSTRA
5 mL da solução de acetato A ₂	1g de polpa liofilizada e triturada
25 mL de etanol 96%	30 mL de etanol 96%
10 mL da solução KOH a 50%	5 mL da solução KOH a 50%
0,5 mL de óleo de coco	2 mL da solução Na ₂ S.9H ₂ O
100 mg de hidroquinona 99%	100 mg de hidroquinona 99%

c) Saponificação

A saponificação é a etapa que tem por objetivo hidrolisar ésteres de tocoferóis; promover a retirada de lipídios e destruir a clorofila presente nas amostras das polpas dos frutos, facilitando, desta forma, a posterior separação, identificação e quantificação dos tocoferóis.

Nesta etapa, os balões contendo a amostra e a amostra de referência foram conectados a condensadores com adição de fluxo de nitrogênio e colocados em banho-maria a 80°C por 30 min., com agitação mecânica. Após o tempo estabelecido, lavou-se os condensadores com 20 mL de água ultra pura. Os balões contendo a amostra e a amostra de referência foram resfriados em banho de gelo.

O material resultante da saponificação foi transferido para um funil de separação. O resíduo restante nos balões foi transferido também para o funil de separação através da adição de 40 mL e 25 mL de água ultra pura para a amostra e para a amostra de referência, respectivamente, garantindo que toda amostra fosse transferida.

d) Extração

O procedimento seguinte foi a extração do material não saponificável que contém a fração rica em vitamina E. Nesta etapa o processo de separação se deu por sólido-líquido através da adição de um solvente que separa o extrato saponificável do não saponificável. Foram realizadas duas extrações em cada amostra utilizando 150 mL e 100 mL de éter dietílico, para a amostra e a amostra de

referência, respectivamente. Após cada adição de solvente, fez-se uma agitação vigorosa para promover a transferência da vitamina para a fase etérea.

Posteriormente, o material saponificável foi descartado e a fração contendo a vitamina foi lavada quatro vezes com 100 mL de uma solução saturada com éter. Após cada lavagem foi adicionada fenolftaleína para verificar o pH da amostra. O número de lavagens foi definido em função do pH da amostra (quando não houvesse mais mudança de cor).

Em seguida, a fração contendo a vitamina foi filtrada em funil e papel de filtro (Whatman Qualitative ϕ 150 mm), sendo coletada em balão de fundo redondo e colo esmerilhado adaptável ao evaporador rotativo.

e) Concentração

O extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Laborota 4000), a temperatura de 35°C e a esta etapa foi utilizado fluxo de nitrogênio para garantir secagem completa.

f) Separação Cromatográfica

Antes da injeção do material no cromatógrafo, os extratos foram redissolvidos em 10 mL de metanol padrão cromatográfico, e adicionados de 200 μ L da solução de acetato A1, padrão interno. Filtrou-se o extrato em unidade filtrante de 0.5 μ m de porosidade (Millipore), e injetou-se na coluna cromatográfica para análise.

As condições cromatográficas utilizadas foram: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), Shimadzu LC10AT_{VP}; injetor automático; pré-coluna Gemini C18 Phenomenex (4,0 x 3,0 mm); coluna Gemini C18 Phenomenex (250x4,60 mm, 5 μ de partícula) fase reversa; detector espectrofotométrico UV-visível, Shimadzu SPD10AV_{VP} e detector de fluorescência, Shimadzu RF10A_{XL}; fase móvel metanol:água (95%:5% v/v); fluxo: 1,0 mL/min.; tempo de corrida: 40 min. Os solventes, antes de serem usados, foram filtrados em unidade filtrante de 0.5 μ m de porosidade. As análises foram conduzidas injetando-se 20 μ L das amostras. Os cromatogramas e a integração das áreas obtidas foram realizados com auxílio de um computador acoplado ao sistema.

A Figura 8 esquematiza as etapas para a determinação do teor de tocoferóis nas polpas liofilizadas dos frutos.

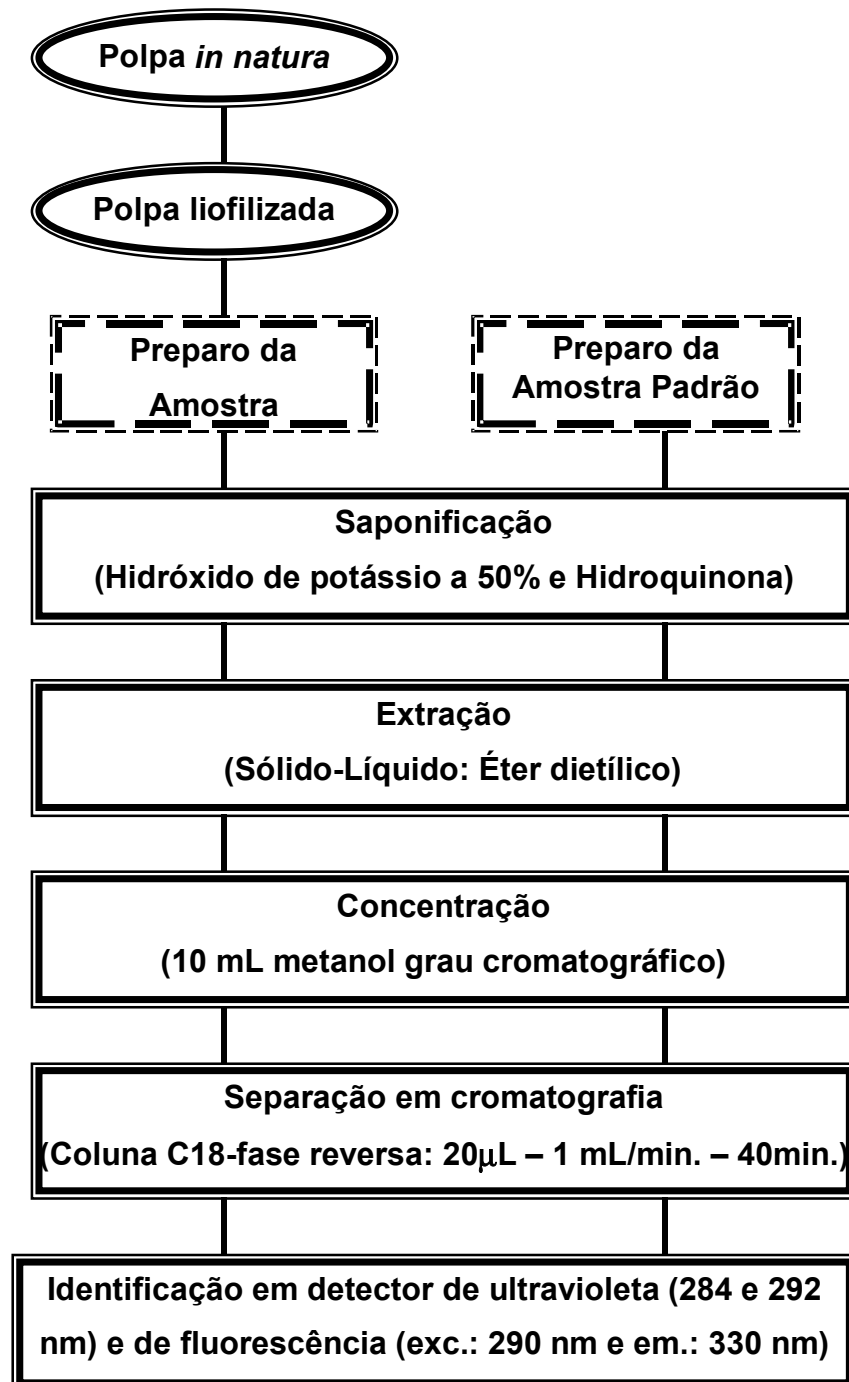


FIGURA 8 – Etapas de determinação do teor de tocoferóis em polpas de frutas, adaptado de Cost (1991).

3.4.3.3 Detecção, Identificação e Quantificação

A detecção dos picos dos padrões comerciais de α -, β -, γ - e δ -tocoferol e do acetato de dl- α -tocoferil foi realizada pela utilização dos detectores de fluorescência (comprimento de onda de excitação das moléculas a 290 nm e de emissão desta fluorescência a 330 nm) e UV (292 nm).

A etapa de identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais de α -, β -, γ e δ -tocoferol, analisados nas mesmas condições propostas para as amostras.

O processo de quantificação de α -, β -, γ - e δ -tocoferol presentes nas amostras foi realizado através de curvas de calibração externa obtidas para cada padrão comercial de tocoferol.

As soluções padrões do α -, β -, γ - e δ -tocoferol foram preparadas a partir da solução comercial de cada um. Para a construção da curva de calibração do α -tocoferol, utilizou-se uma faixa de concentração de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$. No caso do β -, γ - e δ -tocoferol utilizou-se uma mistura dos três padrões com faixa de concentração de 0,2 a 0,7 $\mu\text{g/mL}$ para o β -tocoferol e 0,1 a 0,35 $\mu\text{g/mL}$ para o γ - e δ -tocoferol, cada um. A curva de calibração foi obtida através da relação da área do pico de cada padrão versus a sua concentração.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES

A quantificação dos carotenóides totais presentes nas polpas liofilizadas dos frutos em estudo, foi realizada segundo o método descrito por Talcott e Howard (1999) com algumas modificações, sendo determinado por meio de espectrofotometria em ultravioleta.

3.5.1 Procedimento

A metodologia consistiu em pesar 2 g de polpa de fruta liofilizada. Adicionou-se 25 mL de uma solução acetona-etanol (P.A.) (1:1 v/v) e 250 μL de BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol) diluído na mistura dos solventes, a uma concentração de 20 mg/mL. Homogeneizou-se e filtrou-se o extrato em papel filtro (Whatman Quantitative ϕ 150 mm). O procedimento foi repetido até se obter a descoloração do

resíduo da polpa, em média quatro extrações. Completou-se o volume do extrato, com a solução acetona-etanol, até 100 mL.

As etapas da metodologia citada acima podem ser visualizadas na Figura 9.

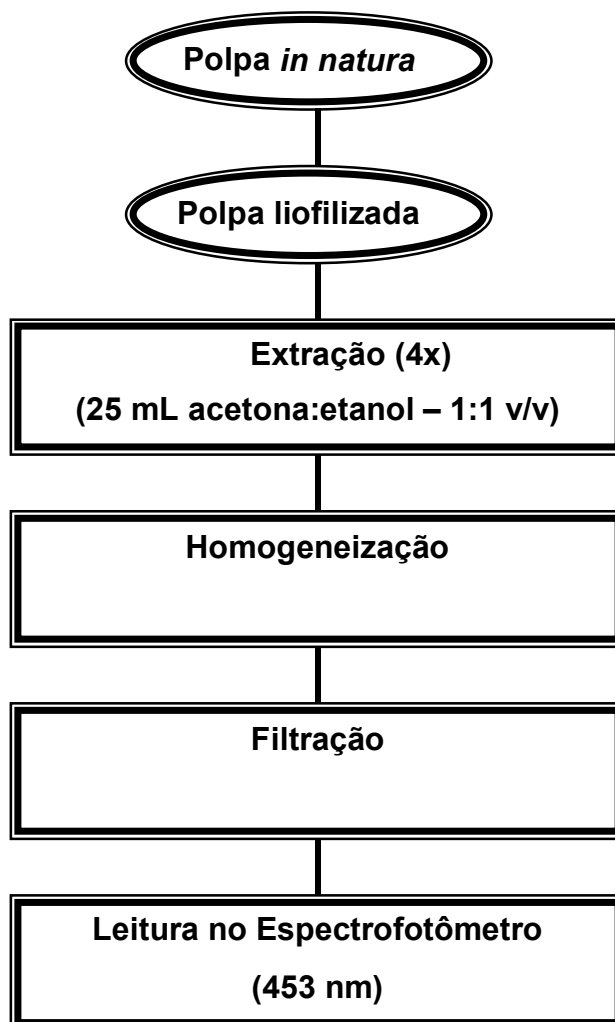


FIGURA 9 – Etapas de determinação quantitativa de carotenóides totais nas polpas de frutas, adaptado de Talcott e Howard (1999).

3.5.2 Preparo da Curva de Calibração do Beta-caroteno

Para a obtenção da curva de calibração do padrão comercial de β -caroteno (Sigma), foi utilizado 5,2 mg desta substância e diluiu-se em 100 mL de hexano P.A. Desta solução, uma alíquota foi submetida a varredura no espectrofotômetro para se conhecer o comprimento de onda de máxima absorção do β -caroteno nas condições propostas e desta forma, utilizá-lo como parâmetro na leitura dos extratos das amostras.

Posteriormente, a partir da solução concentrada preparou-se sete amostras diluídas, cada uma, em 25 mL da mistura acetona-etanol (P.A.), com concentrações variando de 0,4 a 2,8 µg/mL.

3.5.3 Detecção e Quantificação

A detecção dos carotenóides foi realizada em espectrofotômetro, a partir da leitura da absorbância dos extratos obtidos das polpas dos frutos, na região do UV a um comprimento de onda de máxima absorção, em acetona-etanol, de 453 nm.

A etapa de quantificação foi realizada usando curva de calibração do β-caroteno, expressa em microgramas por grama (µg/g) de polpa liofilizada.

4 RESULTADOS

O trabalho foi realizado em duas etapas: implantação de uma metodologia de determinação analítica de tocoferóis e análise de carotenóides totais.

4.1 TOCOFERÓIS

4.1.1 Escolha da Metodologia

Os tocoferóis são compostos lipossolúveis, não saponificáveis presentes em concentrações baixas nos tecidos vegetais. Uma das particularidades destes compostos é a sua propriedade de fluorescência que é muito usada para detectá-los e quantificá-los.

As metodologias de quantificação podem ser classificadas em dois grandes grupos:

❖ Dosagem no óleo (extrato lipossolúvel global)

Esta metodologia baseia-se na análise do óleo obtido dos tecidos vegetais. Geralmente, a extração é sólida/líquida e o solvente usado permite uma extração completa de todos os compostos lipossolúveis. Os solventes mais utilizados são o hexano ou éter de petróleo. Para a identificação dos tocoferóis, uma alíquota diluída é analisada em cromatografia líquida. A separação e identificação das diversas formas de tocoferóis, em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são realizadas com uma coluna de fase normal e um detector ultravioleta e/ou de fluorescência.

❖ Dosagem no extrato lipossolúvel não-saponificável e semi-purificado

Uma metodologia mais específica para a extração e quantificação de tocoferóis, baseia-se na extração e fracionamento do extrato lipossolúvel global. Uma das primeiras etapas, geralmente a saponificação a quente, permite a hidrólise das ligações ésteres, a degradação de compostos não desejáveis (como as clorofilas nos tecidos vegetais) e a quebra dos tecidos, facilitando desta forma a extração de compostos lipossolúveis. A etapa seguinte é a extração sólida/líquida/líquida com um solvente adequado para os compostos não saponificáveis, como o éter dietílico. As detecções e a quantificação da fração

lipossolúvel não saponificável são feitas em CLAE com uma coluna de fase reversa e um detector ultravioleta e/ou de fluorescência.

Para este estudo, optou-se pela segunda metodologia, apesar das vantagens apresentadas pela primeira, como: rapidez, facilidade de implantação e custo. Os critérios determinantes para a escolha desta metodologia foram:

- ♦ O fato desta metodologia ser aplicável para frutos oleaginosos e não oleaginosos.
- ♦ O rendimento da extração dos tocoferóis ser geralmente superior com o uso desta metodologia, o que provavelmente permite uma estimativa mais exata do teor de tocoferóis; pois, um dos objetivos do estudo foi a determinação de tocoferóis em polpas ainda não caracterizadas.
- ♦ O extrato final ser uma fração dos lipídeos totais, e não o extrato total como no caso do óleo. Isto facilita a identificação e a quantificação dos compostos desejados, vantagem importante para implantação de uma metodologia.
- ♦ O uso da CLAE em fase reversa ser mais comum.

Neste sentido, a primeira etapa do trabalho foi estabelecer as condições de separação e de identificação dos tocoferóis em cromatografia líquida. Em um segundo momento, testou-se o protocolo de extração com uma polpa (açaí) já caracterizada na literatura. Por fim, duas amostras de polpas de frutas amazônicas, ainda não caracterizadas, foram analisadas.

4.1.2 Condições de Detecção e Separação dos Tocoferóis

4.1.2.1 Implantação da Metodologia

O protocolo, para a implantação da metodologia, foi adaptado do protocolo descrito por Debier *et al* (1999), adaptado de Cost (1991). Para reproduzir estes protocolos, a separação e a detecção de tocoferóis foram feitas com padrões comerciais de tocoferóis.

4.1.2.2 Detecção dos Tocoferóis em CLAE

Padrões de Tocoferóis Livres

Os padrões de tocoferol foram injetados e detectados de forma individual, em CLAE, a fim de se conhecer o tempo de retenção de cada um deles e desta forma poder identificá-los quando presentes em uma mistura de padrões e/ou fazendo parte da constituição dos extratos obtidos dos frutos.

A detecção foi realizada em detector de fluorescência, pois os tocoferóis também são detectáveis na fluorescência e este parâmetro é muito utilizado, pois confere à detecção uma maior sensibilidade e especificidade. Na Figura 10, pode-se observar os tempos de retenção para cada tocoferol.

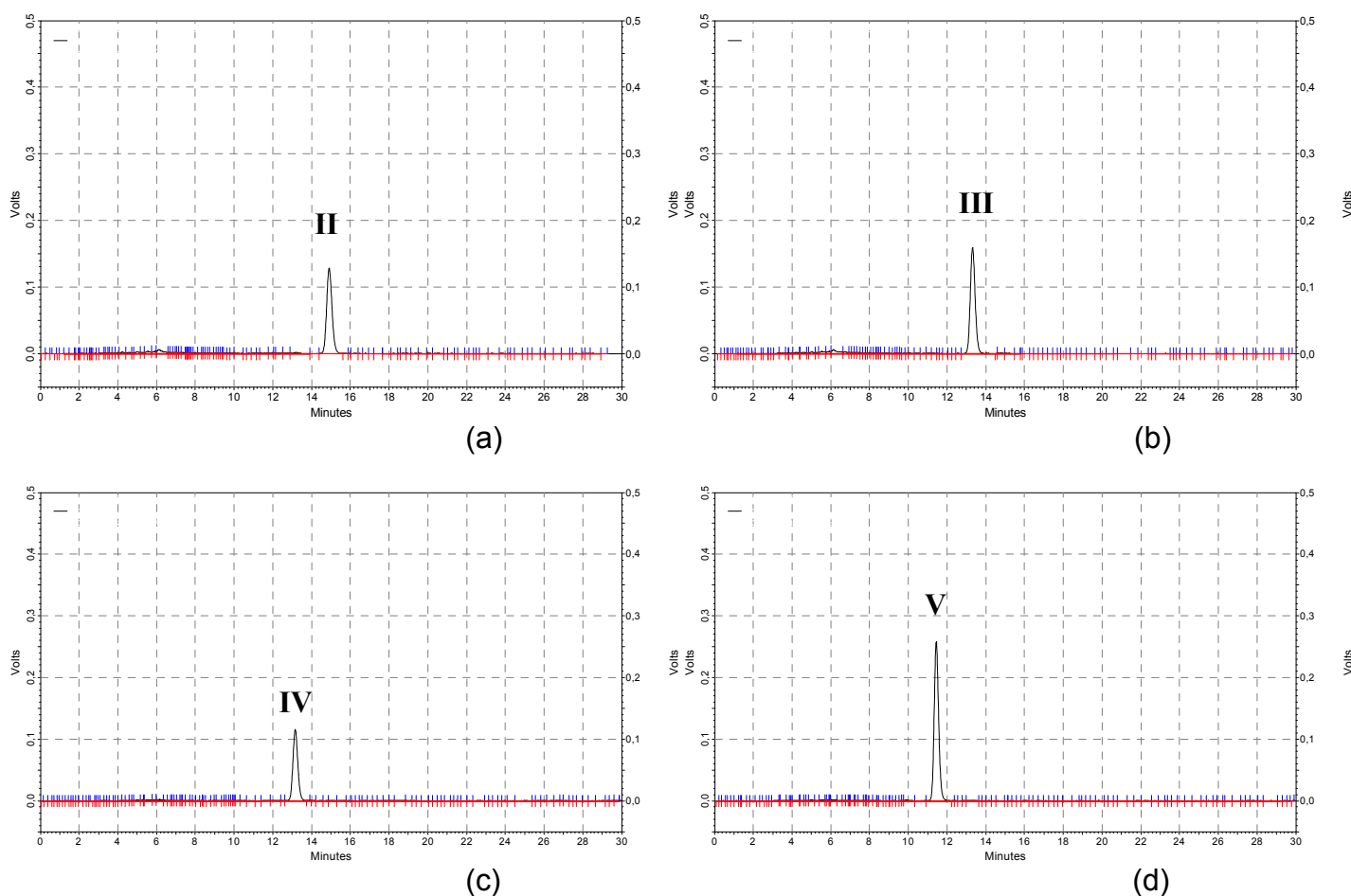


FIGURA 10 – Cromatogramas referentes ao tempo de retenção do α -tocoferol (a), β -tocoferol (b), γ -tocoferol (c) e δ -tocoferol (d).

Os cromatogramas da Figura 10 apresentam os picos representativos dos padrões de alfa (II), beta (III), gama (IV) e delta (V) tocoferol; usando detector de fluorescência.

Os tempos de retenção de eluição destes picos, de acordo com as condições propostas, foram observados aos 15,8 min. para o δ -tocopherol; 19 min. para o β e γ -tocopherol, 22 min. para o α -tocopherol.

Estes dados estão de acordo com a literatura, pois a separação dos tocoferóis, utilizando-se uma coluna C18 (fase reversa) e fase móvel metanol:água, está baseada em relação ao peso molecular e a saturação da cadeia lateral.

Desta forma, os tocotrienóis vão eluir antes dos tocoferóis; fato este relacionado ao nível de saturação da cadeia lateral. Entre os tocoferóis, a separação é feita em relação ao nível de metilação, o que implica na seguinte ordem de saída destes compostos na coluna: delta-T (IV) (apresenta um grupo metil); beta- e gama-T (III+IV) (cada um possui dois grupos metil, consequentemente possuem o mesmo tempo de eluição); alfa-T (II) (apresenta três grupos metil).

4.1.2.3 Separação dos Tocoferóis em CLAE

O método ideal de cromatografia líquida seria aquele que permitisse uma corrida em tempo reduzido e separação, dos diversos compostos de um extrato, com boa resolução. Assim, otimizar a separação de compostos em CLAE é determinar parâmetros que possam diminuir o tempo de corrida (e custo da experimento) e manter uma resolução ótima entre os picos detectados para cada composto (largura do pico, forma do pico, relação à linha de base, etc.).

Neste sentido, realizou-se três corridas utilizando-se a mistura de padrões de tocoferóis livres e acetato de α -tocopheril, com os seguintes parâmetros de vazão da fase móvel metanol:água:

- Metanol 95% e água 5%
- Metanol 93% e água 7%

Uma separação ótima foi obtida usando-se como fase móvel metanol:água à 95:5 v/v, fluxo 1 mL/min e uma corrida de 40 minutos, conforme pode ser visualizado na Figura 11 (b).

Os cromatogramas (a) e (b) da Figura 11 apresentam os picos representativos dos padrões de alfa (II), beta+gama (III+IV) e delta (V) tocoferol.

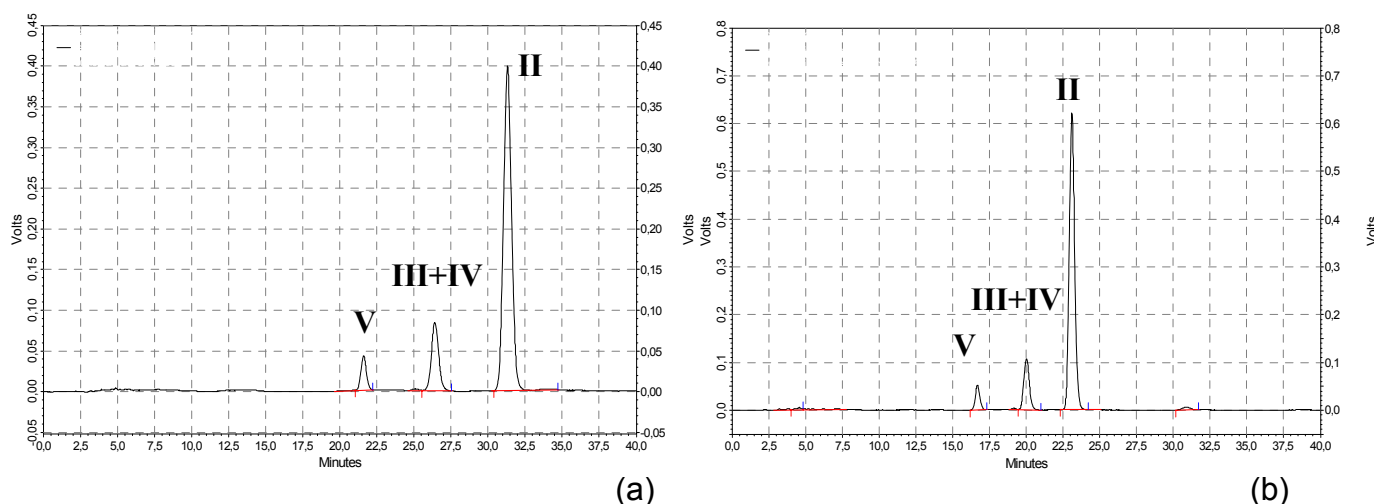


FIGURA 11 – Cromatograma da mistura dos padrões de tocoferol.

Condições cromatográficas: detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm), fluxo 1mL/min., fase metanol:água (97/3 v/v) (a) e (95/5 v/v) (b), coluna Gemini C18 (250x 4,60 nm 5 μ).

Mistura de Padrões de Tocoferóis Livres

Para otimizar a detecção e separação dos padrões de tocoferóis em condições semelhantes às concentrações nos extratos das polpas, preparou-se uma mistura de 90% alfa / 5% beta / 2,5% gama / 2,5% delta-tocoferol comercial. As proporções de cada composto foi determinada em relação a composição média em tocoferóis presentes nas polpas de frutos.

Para confirmar a pureza e autenticidade dos padrões, a absorção máxima da solução foi determinada a partir de uma varredura em espectrofotômetro. Na Figura 12 (a), está apresentado o espectrofotograma desta mistura.

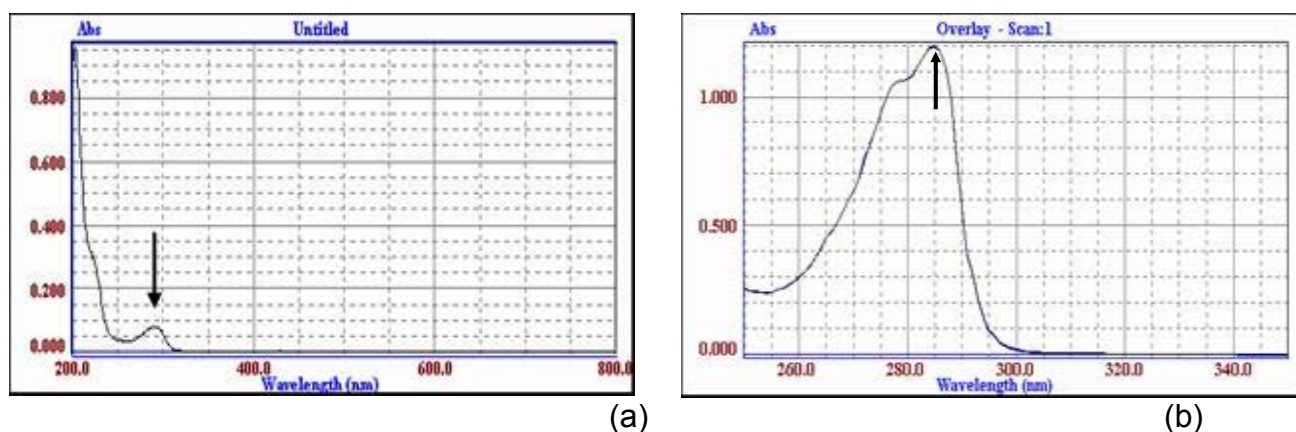


FIGURA 12 – Espectrofotograma da mistura dos padrões de tocoferol (a) e do acetato de α -tocoferil (b).

Espectrofotômetro: varredura de 200 nm a 800 nm, metanol como solvente e cubetas de quartzo (1 cm).

Com base no espectrofotograma obtido (Figura 12a), observou-se que o comprimento de onda de máxima absorção para a mistura de tocoferóis foi de 292 nm. Isto está diretamente ligado ao fato de que a absorção máxima do α -tocoferol é 292 nm e que este composto está presente em uma proporção de 90%. O cromatograma confirma também uma relativa pureza do produto, pois nenhuma absorção diferente foi detectada no visível.

Acetato de dl- α -tocoferil

A mesma determinação do grau de pureza foi realizada para o acetato de alfa-tocoferil. Este composto é geralmente usado como padrão interno do alfa-tocoferol em separação com coluna fase reversa.

A varredura da solução de acetato (Figura 12b) confirmou que o seu comprimento de onda de máxima absorção é de 284 nm, diferenciando dos tocoferóis livres que apresentam uma absorção máxima na faixa de 288-292 nm.

É importante destacar que a presença do grupo acetato nos tocoferóis reduz, consideravelmente, a propriedade de fluorescência da molécula, impedindo a sua detecção na fluorescência. Neste caso, a quantificação do acetato de alfa-tocoferil deve ser em UV (284 nm ou 292 nm). A presença deste grupo na constituição do composto proporciona à molécula um peso molecular superior ao dos tocoferóis livres e consequentemente, o acetato de alfa-tocoferil (I) apresentará tempo de retenção de eluição do seu pico maior, em torno de 30 min.

Com a separação dos tocoferóis otimizada, a etapa seguinte foi de calibração do cromatógrafo, a fim de quantificar as diversas formas de tocoferóis presentes nos extratos das polpas em estudo.

4.1.3 Calibração do Cromatógrafo

Determinação dos Parâmetros da Calibração

A calibração dos detectores do equipamento foi realizada utilizando concentrações crescentes da mistura dos padrões comerciais de tocoferóis, a fim de obter a resposta destes detectores às diversas concentrações e assim, determinar a

faixa ótima de uso do aparelho (detector), ou seja, determinar a faixa de concentração na qual a relação resposta/concentração seja uma regressão linear. A calibração do cromatógrafo líquido foi feita para o detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) para os diversos tocoferóis e está apresentada na Tabela 5.

TABELA 5 – Modelos de regressão linear, obtidos em CLAE, para detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) para os diversos tocoferóis.

TOCOFEROL	CONCENTRAÇÃO	MODELO DE REGRESSÃO	r^2
Alfa	1 a 10 µg/mL	$y = 4,70956 \cdot 10^{-7}x - 0,325004$	0,9986
Beta-gama	0,3 a 1,05 µg/mL	$y = 1,87129 \cdot 10^{-7}x + 0$	0,9937
Delta	0,1 a 0,35 µg/mL	$y = 1,19286 \cdot 10^{-7}x + 0$	0,9908

As curvas de calibração dos diferentes tocoferóis foram feitas com faixas de concentrações diferentes, pois foram determinadas com base nas concentrações geralmente medidas nas polpas de frutas.

Observa-se (Tabela 5) que a declividade e o coeficiente da regressão linear apresentaram valores diferentes, em relação ao tipo de tocoferol e a faixa de concentração usados. Para o beta e gama-tocoferol foi determinada uma regressão para a mistura destes dois compostos, pois em fase reversa não há separação destes compostos.

No sentido de normalizar eventuais variações do equipamento (CLAE) entre as injeções, a adição de uma quantidade fixa de acetato de α -tocoferil serviu de referência para monitorar a reprodutibilidade das análises; logo, um registro da absorção a 284 nm de todas as amostras foi realizado.

Desta forma, a calibração externa realizada com os padrões comerciais de tocoferol permitiu a determinação, nas faixas de concentrações usadas, a relação linear entre as concentrações e a resposta do detector.

Assim, após o término da etapa de calibração, um teste preliminar da extração dos tocoferóis e análise em CLAE, foi realizada com uma polpa de fruta já caracterizada, a polpa de açaí.

4.1.4 Teste Preliminar da Metodologia

O objetivo da realização do teste preliminar foi ter uma primeira estimativa da repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia. Por isso, dois lotes de polpa de açaí foram caracterizados no laboratório.

Os extratos dietil etílico obtidos da polpa de açaí apresentaram-se amarelo-esverdeados e para ter uma idéia global dos compostos presentes nestes extratos, realizou-se uma varredura em espectrofotômetro (Figura 13).

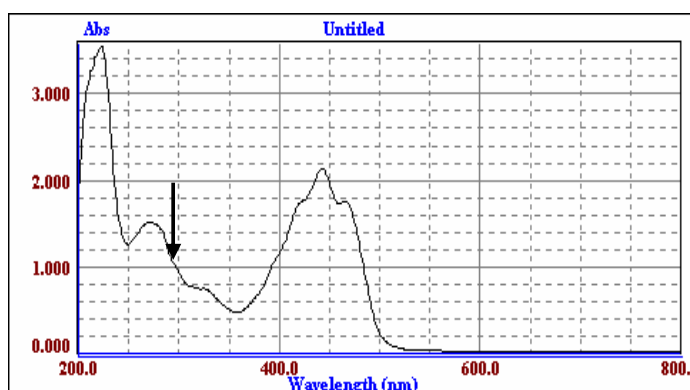


FIGURA 13 - Espectrofotograma do extrato de açaí.

Espectrofotômetro: varredura de 200 a 800 nm; solvente metanol e cubetas de quartzo (1 cm).

Os valores de absorção no visível foram relacionados com a presença de pigmentos na polpa: A coloração amarela relaciona-se com a presença de tocoferóis e/ ou carotenóides, como beta-caroteno e licopeno. No entanto, a análise parece indicar a ausência de clorofilas no extrato, pois houve absorção mínima após o comprimento de onda de 480 nm.

Com o espectrofotograma apresentado na Figura 13, pode-se perceber que o extrato apresentou absorção no UV; porém, esta medida não foi suficiente para concluir sobre a presença e a concentração de tocoferóis no extrato, pois outros compostos provavelmente também foram absorvidos na faixa selecionada.

Para a identificação e a quantificação dos tocoferóis presentes nos extratos de açaí, fez-se análise em CLAE. Na figura 14, estão apresentados os cromatogramas em UV e fluorescência do extrato de açaí.

Nos cromatogramas da Figura 14 (a) e (b), observa-se a presença das formas de tocoferol: α - e β + γ -tocoferol (II e III+IV, respectivamente). O α -tocoferol (II), em acordo com a literatura, representou a maior parte dos tocoferóis totais. O

pico I, referente ao acetato de α -tocoferil, foi detectado só no UV e serviu como padrão interno.

Verifica-se na Figura 14 (a), também a presença de outros compostos que não foram identificados como tocoferóis. Referindo-se ao tempo de retenção e ao tipo de compostos achados nos frutos, os picos detectados a cerca de 10 minutos de corrida podem ser tocotrienóis. Porém, não há padrão comercial de tocotrienol e atualmente o laboratório, referente ao estudo, ainda não possui tocotrienóis para confirmar a identificação. É importante ressaltar que a detecção em fluorescência é mais específica para os tocoferóis.

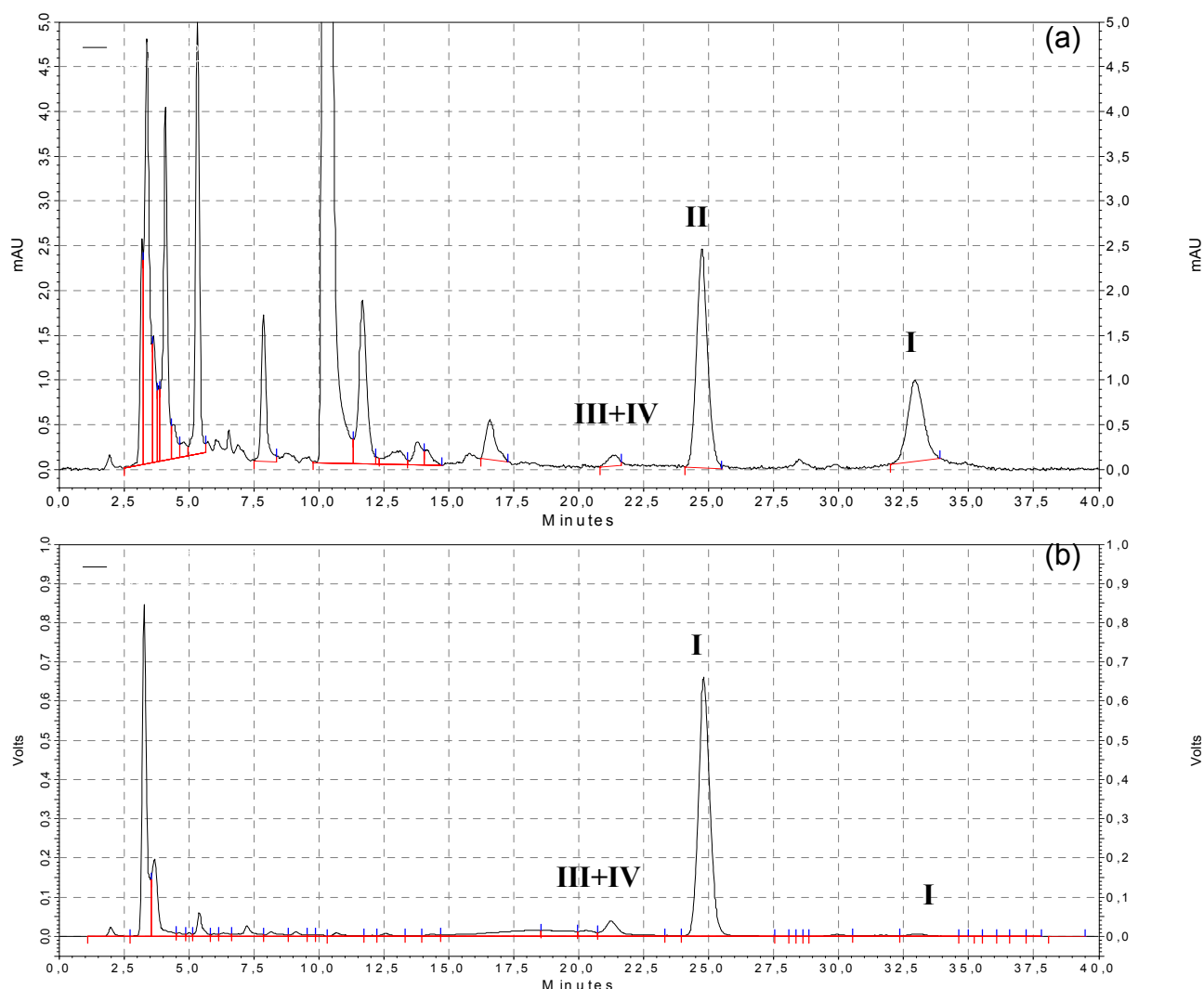


FIGURA 14 – Cromatogramas do extrato de açaí.

Condições cromatográficas: detector ultravioleta a 292 nm (a) e detector de fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) (b), fluxo 1mL/min., fase metanol:água (95/5 v/v), coluna Gemini C18 (250x 4,60 nm 5 μ).

A quantificação dos tocoferóis foi realizada usando a detecção em fluorescência e a curva de calibração externa. Na Tabela 6, estão apresentadas as concentrações encontradas nas polpas de açaí analisadas.

TABELA 6 – Concentrações médias ($\mu\text{g/g m.s.}$) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de açaí de dois lotes diferentes.

	AMOSTRAS DE AÇAÍ			
	Lote 1		Lote 2	
	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.
Alfa	483,22	2,86%	411,45	2,97%
Beta-Gama	12,68	5,42%	8,41	3,22 %
Delta	n.d.	- %	n.d.	- %

Origem: *Abaetetuba – PA e **Limoeiro – PA. n=3 (por lote). nd = não detectado. m.s. = matéria seca. C.V. = coeficiente de variação.

Para a análise destes primeiros dados, relacionou-se os dados obtidos com os de outras análises e fez-se a interpretação com as variações ligadas à metodologia.

- Repetibilidade e reprodutibilidade

Para ter uma estimativa da repetibilidade do método, cada lote de polpa de açaí foi extraído e analisado em triplicata. Para cada lote, o erro relativo foi cerca de 3-5% e pode ser considerado como aceitável para este tipo de metodologia analítica.

A fim de ter uma estimativa da reprodutibilidade, analisou-se polpas de açaí com a mesma procedência das analisadas no trabalho de Rogez *et al* (1996). O trabalho do referido autor foi realizado com a mesma metodologia do estudo atual, porém em um laboratório diferente, na Universidade Católica de Louvain (UCL), Bélgica.

As concentrações de α -tocoferol (Tabela 6) determinadas nas polpas dos frutos de açaí variaram de 411 a 482 $\mu\text{g/g}$ (41 a 48 mg/100g m.s.) de polpa seca, o que está próximo ao valor encontrado no açaí (45 mg/100g m.s.) analisado por Rogez *et al* (1996).

No entanto, é importante ressaltar que a comparação entre a concentração de tocoferol nas amostras foi apenas uma estimativa, pois as matérias-primas utilizadas nos estudos não foram as mesmas, apenas tinham a mesma procedência. Este fato pode explicar a variação entre as duas determinações.

De uma forma geral, a repetibilidade e a reprodutibilidade da metodologia são aceitáveis, pois apresentaram erro relativo inferior a 10%.

4.1.5 Análise nos Frutos

Após o teste preliminar da metodologia, através da análise realizada com polpas de açaí, passou-se a determinação dos compostos de vitamina E dos frutos selecionados para o estudo.

4.1.5.1 Inajá

Os extratos foram analisados em CLAE, nas condições propostas de trabalho. Na Figura 15 estão apresentados os cromatogramas em UV e fluorescência do extrato de inajá.

Os cromatogramas (a) e (b) (Figura 15) apresentam a separação dos compostos do extrato dietil etílico capazes de serem absorvidos a 292 nm e de terem a propriedade de fluorescência, respectivamente. Os cromatogramas foram divididos em três regiões: a primeira entre os tempos 2 e 10 minutos; a segunda entre 10 e 15 minutos e a terceira entre 20 e 38 minutos.

Na primeira região pode-se visualizar vários picos mal separados e em baixas concentrações, a exceção de um pico maior (Figura 15a). Na segunda região, apareceram três picos com boa resolução e tempos de retenção compatíveis aos tempos observados na literatura para os tocotrienóis (Figura 15 a e b).

A terceira região é a de interesse do estudo e apresentou os seguintes tocoferóis: α - e β + γ -tocoferol (II e III+IV, respectivamente), que obtiveram um perfil de separação idêntico ao perfil dos padrões comercial. O α -tocoferol foi a forma que apresentou maior concentração. O pico I é referente ao padrão interno, acetato de α -tocoferil, e não faz parte da composição da amostra (Figura 15 a e b).

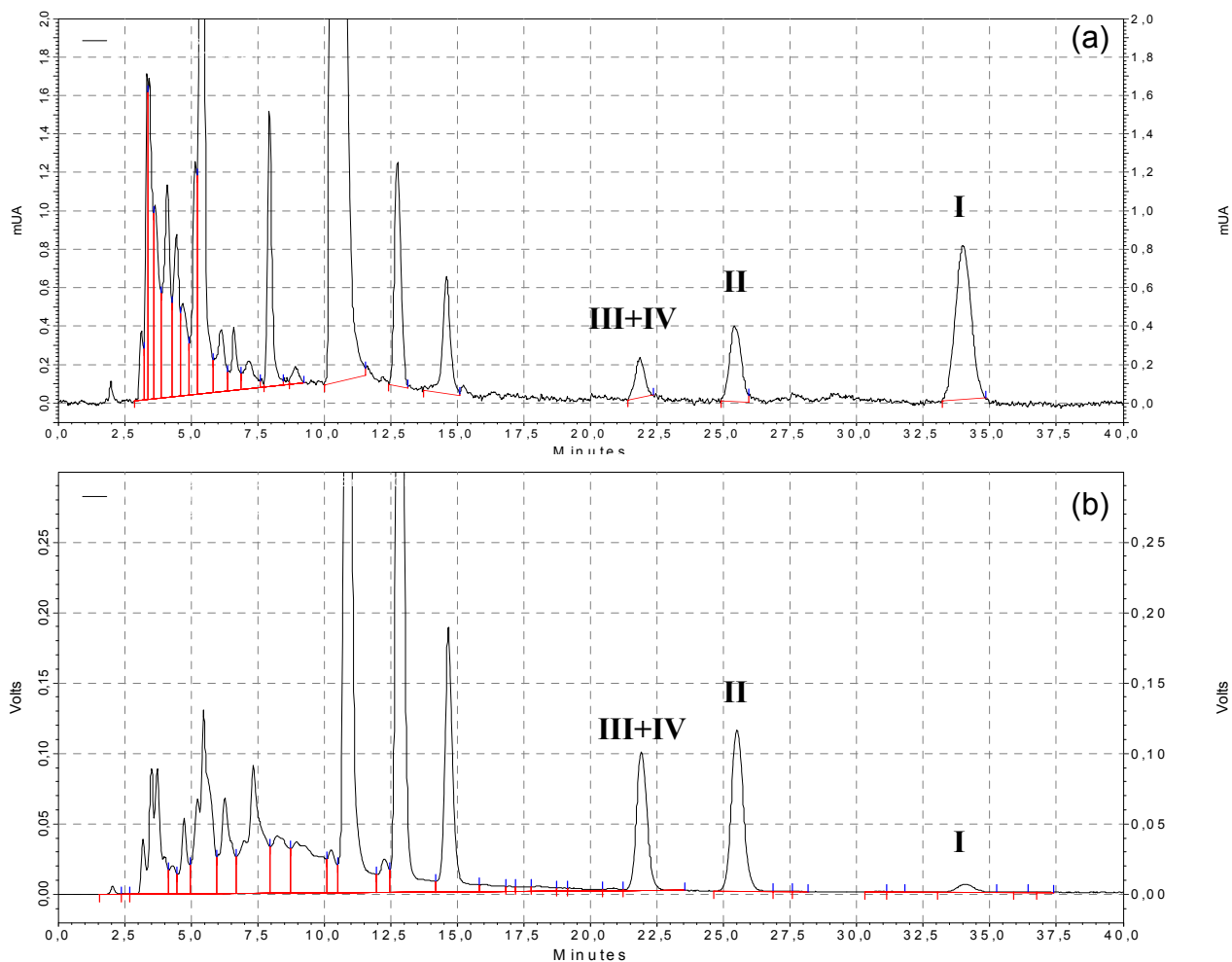


FIGURA 15 – Cromatogramas do extrato de inajá.

Condições cromatográficas: detector ultravioleta a 292 nm (a) e fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) (b), fluxo 1mL/min., fase metanol:água (95/5 v/v), coluna Gemini C18 (250x 4,60 nm 5 μ).

Desta forma, os cromatogramas (a) e (b) (Figura 15) confirmaram a presença de tocoferóis na polpa de inajá. A etapa seguinte foi a de quantificação destes compostos. Na Tabela 7 estão apresentadas as concentrações de tocoferol presentes nas polpas dos frutos de inajá, distribuídos por lote.

Os resultados demonstraram uma variação importante entre os teores de tocoferóis dos lotes. No caso do alfa-tocoferol, o lote 1 apresentou uma concentração 2,1 vezes superior ao lote 2 e 12,5 vezes superior ao lote 3. Esta proporcionalidade do teor entre os lotes, no entanto, apresentou-se diferente para o beta-gama e delta-tocoferol.

TABELA 7 - Concentrações médias ($\mu\text{g/g m.s.}$) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de inajá de três lotes diferentes.

	AMOSTRAS DE INAJÁ					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.
Alfa	221,00	50,35%	106,81	3,88%	17,60	14,92%
Beta-Gama	32,10	72,63%	19,26	16,17%	6,20	5,97%
Delta	1,03	8,46%	0,72	24,90%	0,28	8,88%

n=3 (por lote). m.s. = matéria seca. C.V. = coeficiente de variação.

Através dos dados apresentados na Tabela 7, observa-se que houve problema na repetibilidade das amostras; pois os coeficientes de variação foram superiores a 10% para quase todas as formas de tocoferol, em todos os lotes.

No caso do teste preliminar com o açaí, a repetibilidade das extrações foi em torno de 3-5%; no entanto, com o inajá obteve-se para o composto principal, o alfa-tocoferol, presente em maior quantidade, um coeficiente de variação de 50%.

Considerando esta primeira discussão sobre a repetibilidade das amostras de inajá, percebe-se que as análises dos resultados apontam para um problema de repetibilidade da metodologia neste tipo de fruto, o que impede uma conclusão e determinação das variações no teor de tocoferóis entre os lotes, pois não houve parâmetros suficientes para estimar se estas variações foram peculiares à polpa ou se houve problema de aplicação da metodologia.

A hipótese das variações serem em consequência do tipo de amostra está relacionada ao fato da polpa deste fruto ser bastante fibrosa o que provavelmente dificultou o seu tratamento (homogeneização) e, por conseguinte a extração da fração lipossolúvel não saponificável. No entanto, no açaí, polpa usada no teste preliminar, não se observou esta dificuldade uma vez que se analisou o suco de açaí, uma amostra em finas partículas e bastante homogeneizada.

Por outro lado, pode-se afirmar que há presença de tocoferóis nas polpas de inajá, pois o perfil de separação dos tocoferóis destes frutos foi compatível com o perfil encontrado nos frutos de açaí; no entanto, a quantificação (exata) de cada tocoferol não foi possível de ser determinada.

Desta forma, é necessário realizar uma adaptação da metodologia a este tipo de polpa, que apresenta a propriedade de ser fibrosa, além de ser oleaginosa, pois se determinou, através da caracterização físico-química, que estas polpas apresentam, em média, 70% de lipídeos na sua constituição.

4.1.5.2 Mari

Os extratos dietil etílicos foram analisados em CLAE, nas condições propostas de trabalho. Na Figura 16, estão apresentados os cromatogramas em UV e fluorescência do extrato de mari.

Os perfis de separação dos tocoferóis foram semelhantes àqueles determinados para o açaí e o inajá. De forma semelhante ao inajá, distinguiu-se globalmente nos cromatogramas do extrato de mari três regiões.

A primeira região (Figura 16a) apresentou comportamento semelhante a do inajá (Figura 15a). Na segunda região (Figura 16b), apareceram os picos observados no cromatograma (a) (Figura 15); porém estes mesmos picos não foram visualizados no cromatograma (b) (Figura 16).

Na terceira região também se encontrou, como os principais tocoferóis presentes na composição da polpa de mari, o α - e β + γ -tocoferol (II e III+IV, respectivamente), que obtiveram um perfil de separação idêntico ao perfil dos padrões comercial. O α -tocoferol foi a forma que apresentou maior concentração. Vale ressaltar que o pico I não faz parte da composição da amostra pois é referente ao padrão interno, acetato de α -tocoferil (Figura 16 a e b).

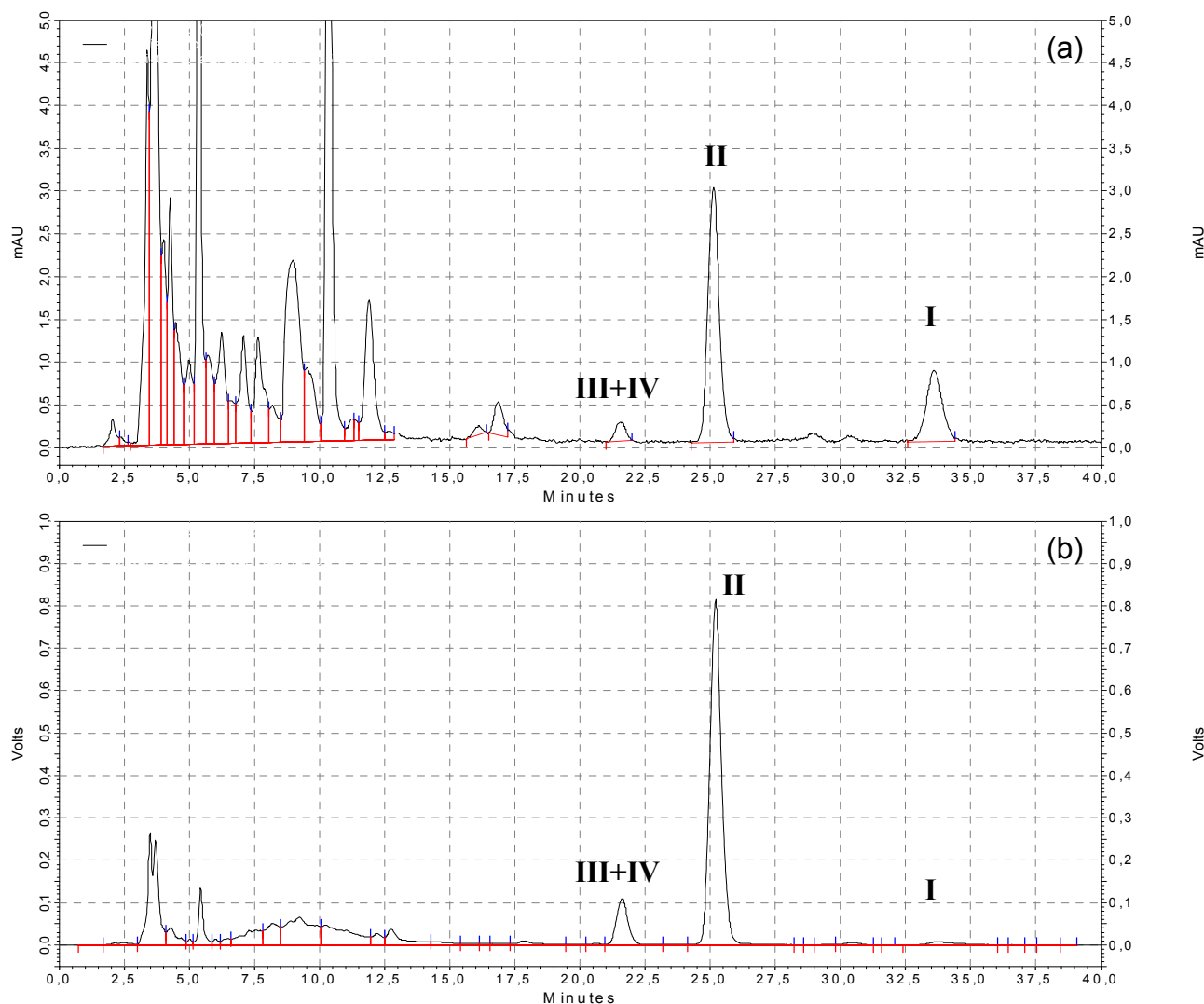


FIGURA 16 – Cromatogramas do extrato de mari.

Condições cromatográficas: detector ultravioleta a 292 nm (a) e fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm) (b), fluxo 1mL/min., fase metanol:água (95/5 v/v), coluna Gemini C18 (250 x 4,60 nm 5 μ).

Neste sentido, através dos cromatogramas (a) e (b) (Figura 16) confirmou-se a presença de tocoferóis na polpa de mari. A etapa seguinte foi a de quantificação destes compostos. Na Tabela 8 estão apresentadas as concentrações de tocoferol presentes nas polpas dos frutos de mari, distribuídos por lote.

Com os dados apresentados na Tabela 8, pode-se perceber que dos três lotes analisados, somente o lote 3 apresentou todos os coeficientes de variação a baixo do limite de 10%, pois o lote 2 apresentou coeficiente de variação em torno de 10% e o lote 1 entre 8 e 80%, para a concentração dos tocoferóis.

TABELA 8 - Concentrações médias ($\mu\text{g/g m.s.}$) das formas de tocoferóis presentes nas polpas de mari de três lotes diferentes.

	AMOSTRAS DE MARI					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.	Media ($\mu\text{g/g m.s.}$)	C.V.
Alfa	197,58	8,73%	146,88	11,40%	149,89	2,11%
Beta-Gama	6,94	21,12%	7,87	11,94%	10,40	1,97%
Delta	0,653	82,57%	0,81	13,75%	1,08	3,72%

n=3 (por lote). m.s. = matéria seca. C.V. = coeficiente de variação.

Estas variações nos coeficientes podem ter sido em consequência da dosagem das concentrações, pois o coeficiente de variação foi maior quando a concentração do composto apresentou-se menor.

Este fenômeno geralmente pode está ligado a precisão dos aparelhos de medida (por exemplo, CLAE), ou também aos efeitos de massa e de sinergismo entre os compostos. Assim, a precisão do equipamento foi maior para o alfa tocoferol do que para o delta-tocoferol, uma vez que a concentração do alfa-tocoferol foi 150 vezes maior que a do delta. Isso pode explicar a obtenção de coeficientes de variação elevados para as triplicatas de delta-tocoferol. Este fato foi verificado tanto para as amostras de mari quanto para as de inajá.

Desta forma as determinações referentes ao lote 2 puderam ser consideradas validas. Porém, os resultados do lote 1 foram considerados os menos confiáveis, provavelmente pelo fato de que houve, entre as formas de tocoferol, uma variação importante dos coeficientes (8% a 80%).

Com as considerações feitas para o lote 2, pôde-se estabelecer junto com os dados pertencentes ao lote 3 (coeficientes de variação inferiores a 10%) a média da concentração em tocoferol nas polpas de mari. Na Tabela 9 estão apresentados os valores médios das concentrações das diferentes formas de tocoferol presentes nas polpas de mari.

Os dados apresentados na Tabela 9 confirmam que o alfa-tocoferol representa cerca de 90% dos tocoferóis presentes nas polpas de mari.

TABELA 9 – Valores médios das concentrações ($\mu\text{g/g}$) das diferentes formas de tocoferol presentes nas polpas de mari.

TOCOFEROL	%*	[C] MÉDIA (g de polpa seca)	[C] (100g de polpa fresca) (U=50%)	[C] (67g /fruto) 31% de polpa
Alfa T	93,65	148,40 μg	7,42 mg	1,54 mg
Beta-Gama T	5,75	9,14 μg	0,46 mg	0,10 mg
Delta T	0,60	0,95 μg	0,05 mg	0,01 mg
TE		0,15117	7,56	1,57

* representação percentual da forma de tocoferol presente na polpa. U = unidade. TE = α -tocopherol, mg x 1 TE; β + γ -tocopherol, mg x 0,3 TE; δ -tocopherol, mg x 0,03 TE.

A concentração de vitamina E em sementes oleaginosas geralmente é elevada e representa uma de suas características nutricionais mais importantes. Em matérias-primas como avelã e sementes de girassol, o teor de vitamina E é abundante, em torno de 25 mg/100g e 46 mg/100g, respectivamente.

A concentração média de tocoferol na polpa dos frutos de mari foi de 158,49 $\mu\text{g/g}$ de m.s., teor inferior àquele encontrado no açaí. Porém, quando se compara com o estudo realizado por Delgado-Zamarreño *et al* (2001) em sementes e nozes percebe-se que os valores encontrados para o mari foram próximos aos valores do referido estudo.

A importância desta vitamina para as frutas está relacionada a propriedade de proteção dos lipídeos insaturados contra a oxidação, permitindo sua conservação. De maneira semelhante, a vitamina E age no corpo humano, inibindo a ação dos radicais livres sobre as células do organismo.

No entanto, os humanos não são capazes de biossintetizar esta vitamina, sendo necessário suprir suas necessidades através da dieta. Assim, a ingestão diária de vitamina E é em torno de 15 a 19 mg de α -tocopherol (1 mg de d- α -tocopherol é equivalente à 1 TE).

Desta forma, para suprir esta recomendação de vitamina E, seria necessário o consumo de 200 g de polpa fresca de mari, equivalente ao conteúdo de polpa de 9 frutos, uma vez que estes frutos apresentaram peso médio de 67 g (Tabela 13).

A ingestão de cápsulas gelatinosas de acetato de dl- α -tocopheril (formas farmacêuticas) parece ser alternativa para suprir as recomendações diárias, pois podem ser encontradas em apresentações de 100 ou 400 mg. Isto corresponderia a

um consumo de 60 frutos de mari para equivar a ingestão diária de uma cápsula de 100 mg.

Porém, a cápsula de acetato de dl- α -tocoferil, só é absorvida após hidrólise do éster, ao nível das porções intermediárias do intestino delgado, em uma proporção de 20 a 40% aproximadamente; enquanto que, a absorção do α -tocoferol no organismo é praticamente de 100%.

Estes primeiros resultados abrem perspectivas tanto na área da nutrição quanto na de tecnologia de alimentos, pois este tipo de fruto pode ser considerado como fonte apreciável em tocoferóis.

4.2 CAROTENÓIDES

4.2.1 Determinação de Carotenóides

A determinação dos carotenóides nas polpas das frutas selecionadas foi realizada por espectrofotometria que fornece uma estimativa geral do conteúdo de β -caroteno presente na amostra.

Segundo as informações da literatura, a proporção de β -caroteno, em relação ao teor total de carotenóides, é bastante elevada. Neste sentido, a quantificação dos carotenóides foi feita considerando que o β -caroteno representa quase que a totalidade dos carotenóides. Assim, o padrão usado para a determinação dos carotenóides totais foi o β -caroteno.

4.2.2 Curva de Calibração do β -Caroteno

No sentido de confirmar o grau de pureza do padrão comercial, realizou-se um espectro de varredura, apresentado na Figura 17.

O espectrofotograma de varredura da solução de β -caroteno (Figura 17) apresentou dois comprimentos de onda de absorção máxima a 453 nm e 470 nm; sendo o comprimento de onda a 453 nm o que apresentou uma maior absorção. Isso permitiu confirmar a identificação do β -caroteno e selecionar o comprimento de onda de 453 nm para realizar as análises.

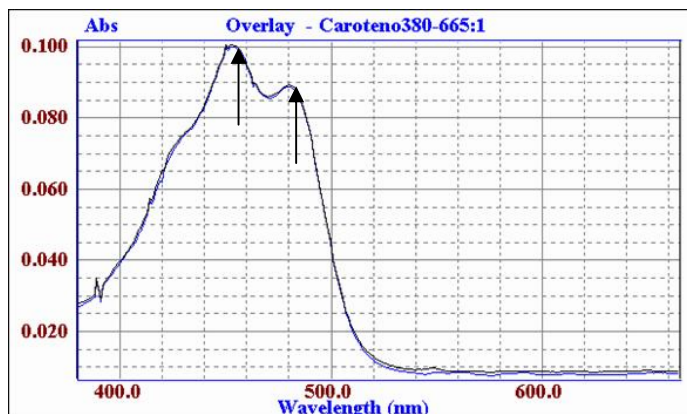


FIGURA 17 – Espectrofotograma do padrão comercial de β -caroteno.

Espectrofotômetro: varredura de 380 a 665 nm; solvente acetona-etanol e cubetas de quartzo (1cm).

A curva de calibração foi obtida a partir de várias soluções preparadas com concentrações diferentes do padrão de β -caroteno. Na Figura 18, está apresentada a curva de calibração do padrão de β -caroteno.

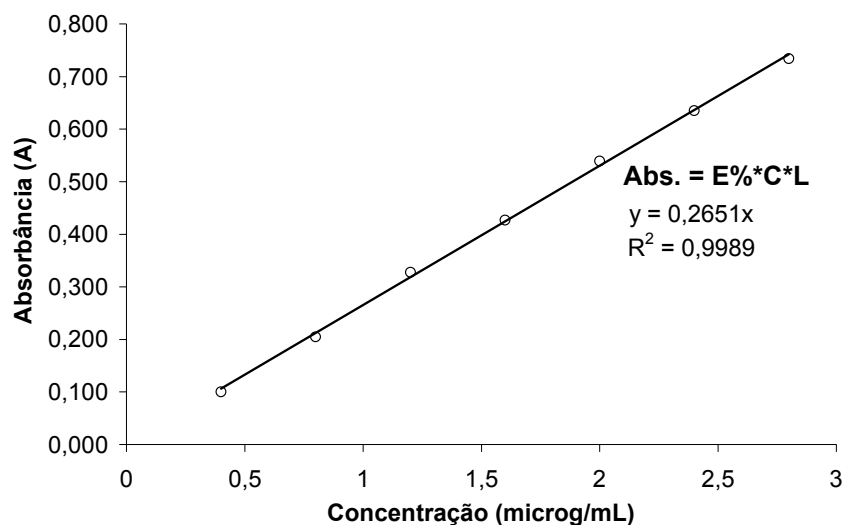


FIGURA 18 – Curva de calibração do β -caroteno.

Espectrofotômetro: comprimento de onda 453 nm; solvente acetona-etanol e cubetas de quartzo (1cm).

A faixa de concentrações usadas foi de 0,4 a 2,8 $\mu\text{g/mL}$. As absorções das alíquotas a 453 nm apresentaram valores de absorbância entre 0,100 e 0,734 A.

Através da linearização destes dados, obteve-se a curva de calibração com coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,9989.

Os parâmetros da Lei de Lambert-Beer foram determinados para obter-se o valor da absorvidade molecular que foi calculado em 2651, a partir da curva de calibração. O valor da absorvidade está relacionado ao tipo de solvente utilizado.

Esta relação entre concentração em β -caroteno e absorção foi usada para quantificar os carotenóides totais nas amostras.

4.2.3 Quantificação de Beta-caroteno nas Frutas

Considerando que o β -caroteno representa quase a totalidade dos carotenóides em polpa de frutas, a curva de calibração determinada foi usada para quantificar os carotenóides totais.

Na Figura 19 estão apresentados os valores médios, por lote, dos teores de β -caroteno, em base seca, nas polpas dos frutos.

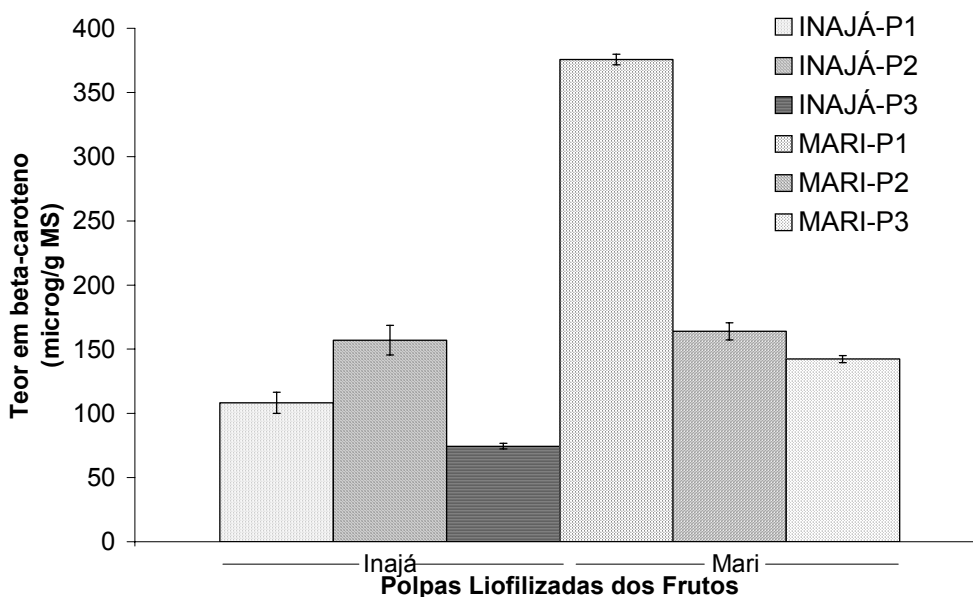


FIGURA 19 – Média, por lote, do teor em β -caroteno ($\mu\text{g/g}$ matéria seca) das polpas de inajá e mari.

Observa-se, na Figura 19, que as médias dos teores em β -caroteno contidos nas polpas dos frutos variaram de 74 - 157 $\mu\text{g/g}$ no inajá e de 142 - 376 $\mu\text{g/g}$ no mari. Vale ressaltar que estes valores podem estar subestimados, pois na etapa de filtração do extrato há retenção de pigmentos no papel filtro usado, não se tendo a possibilidade de determinar esta perda.

4.2.3.1 Inajá

As polpas dos frutos de inajá (P1, P2 e P3) foram analisadas em triplicata. O coeficiente de variação calculado entre as triplicatas ficou na faixa de 2,91-7,57%. Geralmente, admite-se uma variação de até 10% como aceitável para este tipo de determinação.

O teor em beta-caroteno entre os lotes apresentou variação importante. As polpas oriundas do lote 2 apresentaram uma concentração média 1,44 vezes maior do que as amostras do lote 1 e 2,10 vezes maior do que as do lote 3.

Segundo Rodriguez-Amaya (2000), o conteúdo de carotenóides pode ser afetado por uma série de fatores como: o grau de maturação, o tipo de solo e as condições de cultivo, as condições climáticas, a variedade dos vegetais, a parte da planta consumida, o efeito dos agrotóxicos, a exposição à luz solar, as condições de processamento e a estocagem.

Para ter uma estimativa das condições fisiológicas e eventualmente do genótipo das plantas coletadas, os parâmetros físico-químicos destes frutos foram determinados (Tabelas 10 e 11) com o objetivo de tentar relacionar ao teor em carotenóides.

TABELA 10 – Caracterização física dos frutos de inajá, distribuídos por lote.

AMOSTRA	PARÂMETROS ANALISADOS					
	Massa (g)	Com (cm)	ϕ (cm)	Casca(%)	Polpa(%)	Semen(%)
Inajá-P1	30,00 $\pm$ 3,71	5,50 $\pm$ 0,33	3,12 $\pm$ 0,15	24,96	32,40	42,64
Inajá-P2	40,33 $\pm$ 4,34	6,12 $\pm$ 0,34	3,57 $\pm$ 0,20	18,88	38,42	42,69
Inajá-P3	25,48 $\pm$ 3,43	5,41 $\pm$ 0,31	3,21 $\pm$ 0,17	20,92	38,30	40,78

Com = comprimento. ϕ = diâmetro. Semen = semente. n=30.

Observa-se na Tabela 10 que os tamanhos dos frutos foram semelhantes entre os lotes; porém, as massas apresentaram-se diferentes.

A proporção média de polpa do lote 2 foi maior que a do lote 1 (1,19 vezes) porém não diferiu da proporção média do lote 3, apesar deles terem apresentado massas bem distintas. Estas diferenças podem estar ligadas ao grau de maturação dos frutos; pois, após a maturação não há mais aumento no tamanho do fruto.

Outro parâmetro importante para monitorar o estado de maturação do fruto foi o teor de lipídeos, devido às mudanças químicas que ocorrem nesta fase do fruto.

Observa-se na Tabela 11 que as amostras pertencentes ao lote 3 obtiveram teores em lipídeos superiores às amostras do lote 1 e 2 em 1,20 e 1,08 vezes, respectivamente. No entanto, quando se compara o teor em lipídeos aos resultados de concentração em β -caroteno destes frutos pertencentes ao lote 3, percebe-se que foi o que apresentou menor concentração. Este fato pode estar relacionado ao grau de maturação do fruto, o que provavelmente pode interferir na concentração de carotenóides presentes na polpa.

TABELA 11 – Caracterização físico-química das polpas de inajá, em base seca, distribuídos por lote.

AMOSTRA	PARÂMETROS ANALISADOS			
	Cinzas (g/100g m.s.)	Lipídeos (%) m.s.)	Proteína* (g/100g m.s.)	Umidade(%) (<i>in natura</i>)
Inajá-P1	3,62 $\pm$ 0,21	65,10 $\pm$ 0,41	7,03 $\pm$ 0,13	45,77 $\pm$ 1,64
Inajá-P2	3,83 $\pm$ 0,15	72,61 $\pm$ 0,30	6,91 $\pm$ 0,22	52,32 $\pm$ 0,70
Inajá-P3	3,92 $\pm$ 0,01	78,47 $\pm$ 0,86	7,17 $\pm$ 0,20	54,00 $\pm$ 1,05

*N x 6,25. n=3.

Como a repetibilidade dentro dos lotes apresentou coeficientes de variação inferiores a 10%, pôde-se considerar que todas as análises foram validadas e desta forma determinou-se a concentração média em β -caroteno presente nas polpas de inajá. Este dado encontra-se na Tabela 12.

TABELA 12 – Valor médio da concentração (μ g/g) em carotenóides presentes nas polpas de inajá.

	%*	[C] MÉDIA (g de polpa seca)	[C] (100g de polpa fresca) (U=50%)	[C] (32g /fruto) 36% de polpa
β -caroteno	90	113,30 μ g	5,70 mg	0,70 mg
RE		18,9	950	117

* representação percentual da forma de carotenóide presente na polpa. [C] = concentração. U = umidade. 1RE = 6 μ g β -caroteno.

Quando se compara o valor encontrado do teor em β -caroteno da polpa de inajá (Tabela 12) com os valores encontrados por Rodrigues-Amaya (1996) para

frutos oriundos de palmeiras do norte do país, como buriti, tucumã, bocaiuva e pupunha, observa-se que o fruto em estudo apresentou teor em β -caroteno inferior ao encontrado no buriti (360 $\mu\text{g/g}$). Porém, quando se comparou aos outros frutos referenciados, notou-se que a concentração no inajá apresentou-se ligeiramente maior em relação ao tucumã (107 $\mu\text{g/g}$) e que foi significativamente superior a dos outros dois frutos: bocaiuva (55 $\mu\text{g/g}$) e pupunha (22 $\mu\text{g/g}$).

Desta forma, os frutos de inajá para suprirem as necessidades de ingestão diária dos seres humanos neste nutriente, uma vez que não possuem a capacidade em biossintetizá-lo, devem ser consumidos em torno de 100 g/dia de polpa fresca, o correspondente a oito frutos por dia.

Neste sentido, pode-se considerar o fruto de inajá como fonte relevante em carotenóides.

4.2.3.2 Mari

Como realizado para o fruto de inajá, as polpas do fruto de mari foram analisadas em triplicata. Os coeficientes de variação encontrados entre as triplicatas dentro dos lotes ficou na faixa de 1,1-4,1%. Estes valores apresentaram-se dentro do limite aceitável de coeficiente de variação (<10%) para o tipo de análise e foram menores do que os valores encontrados para o inajá.

O teor em beta-caroteno entre os lotes deste fruto apresentou variação importante. As polpas oriundas do lote 1 apresentaram uma concentração média 2,29 vezes maior do que as amostras do lote 2 e 2,63 vezes maior do que as do lote 3.

Do mesmo modo como realizado para o inajá, determinou-se os parâmetros físico-químicos destes frutos (Tabelas 13 e 14), na tentativa de estimar as condições fisiológicas e eventualmente o genótipo das plantas coletadas, com a relação do teor em carotenóides destes frutos.

Observa-se na Tabela 13 que o tamanho dos frutos foram bem semelhante entre os lotes, assim como as massas. Porém, observou-se que a proporção média de polpa do lote 1 foi maior que a dos outros lotes (1,21 vezes e 1,27 vezes, respectivamente). Isso poderia estar relacionado a um grau de maturação diferente.

TABELA 13 – Caracterização física dos frutos de mari, distribuídos por lote.

AMOSTRA	PARÂMETROS ANALISADOS					
	Massa (g)	Com (cm)	φ (cm)	Casca(%)	Polpa(%)	Semen(%)
Mari-P1	67,50±11,66	6,46±0,39	4,50±0,21	38,47*		61,53
Mari-P2	67,11±10,29	6,86±0,64	4,19±0,25	31,67*		68,33
Mari-P3	71,03±13,78	7,15±0,71	4,13±0,30	30,41*		69,59

*casca e polpa foram considerados como uma única parte. Com = comprimento. φ = diâmetro. Semen = semente. n=30.

O teor em lipídeos também foi um parâmetro importante para monitorar o estado de maturação do fruto, como foi comentado no caso do inajá. Observa-se na Tabela 14 que as amostras pertencentes ao lote 1 foram superiores às amostras do lote 2 e 3 em 1,08 e 1,35 vezes, respectivamente para o teor em lipídeo, o que pode estar relacionado a concentração elevada destes frutos em β-caroteno, uma vez que fazem parte da fração lipossolúvel.

TABELA 14 – Caracterização físico-química das polpas de mari, em base seca, distribuídos por lote.

AMOSTRA**	PARÂMETROS ANALISADOS			
	Cinzas (g/100g m.s.)	Lipídeos (%) m.s.)	Proteína* (g/100g m.s.)	Umidade(%) (<i>in natura</i>)
Mari-P1	5,82±0,22	82,36±0,30	4,94±0,11	65,62±0,28
Mari-P2	4,79±0,02	76,06±0,79	4,47±0,05	57,51±1,81
Mari-P3	3,96±0,005	60,89±0,14	5,85±0	49,50±1,26

*N x 6,25. ** casca e polpa foram considerados como uma única parte. n=3.

Como o coeficiente de variação da repetibilidade das amostras analisadas foram inferiores a 10%, pôde-se considerar que todas as análises foram validadas e desta forma determinou-se a concentração média em β-caroteno presente nas polpas de mari. Este dado pode ser encontrado na Tabela 15.

Quando se compara o valor encontrado do teor em β-caroteno da polpa de mari (Tabela 15) com os valores encontrados por Rodrigues-Amaya (1996) observa-

se que o fruto de mari, assim como o de inajá, apresentou teor em β -caroteno inferior ao encontrado no buriti (360 $\mu\text{g/g}$).

TABELA 15 – Valor médio da concentração ($\mu\text{g/g}$) em carotenóides presentes nas polpas de mari.

	%*	[C] MÉDIA (g de polpa seca)	[C] (100g de polpa fresca) (U=50%)	[C] (67g /fruto) 31% de polpa
β -caroteno	90	227,30 μg	11,4 mg	2,40 mg
RE		38	1900	400

* representação percentual da forma de carotenóide presente na polpa. [C] = concentração. U = umidade. 1RE = 6 μg β -caroteno.

Porém, quando se compara com os valores encontrados para o tucumã (107 $\mu\text{g/g}$), bocaiuva (55 $\mu\text{g/g}$) e pupunha (22 $\mu\text{g/g}$), observa-se que o teor em β -caroteno no mari foi significativamente superior ao teor destes frutos. É notável também, que o teor deste carotenóide foi duas vezes maior no fruto de mari quando comparado ao de inajá.

Assim, seria necessário o consumo de 50 g de polpa fresca de mari para que a recomendação de vitamina A diária dos seres humanos fosse suprida. Este consumo em polpa é equivalente ao consumo de três frutos diariamente, o que o torna uma fonte relevante em carotenóides.

5 CONCLUSÃO

A primeira etapa do trabalho foi focalizada sobre a seleção e a implantação de metodologia de determinação de vitamina E e pró-vitamina A.

Quanto a implantação da metodologia de determinação de vitamina E, conseguiu-se reproduzir o protocolo de Debier *et al.* (1996) adaptado de Cost (1991). A metodologia foi baseada na extração e separação em cromatografia líquida do extrato lipossolúvel não saponificável da polpa de fruta.

Com o uso de uma mistura de padrões comerciais (90% alfa / 5% beta / 2,5% gama / 2,5% delta-tocoferol) determinou-se os parâmetros ótimos para a separação e detecção dos tocoferóis. As condições de separação em CLAE foram: coluna em fase reversa C18, fase móvel metanol/água 95/5 (v/v), fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se detecção tanto com absorção no ultravioleta (292 nm) quanto em fluorescência (exc. 290 nm e em. 330 nm)

Para determinar repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia, um teste preliminar foi realizado com amostras de açaí. Os coeficientes de variação das análises foram inferiores a 10%, garantindo uma boa repetibilidade das análises, pois geralmente este é o limite aceitável de validação de metodologia analítica.

Os resultados obtidos com a polpa de inajá apresentaram baixa repetibilidade, com coeficiente de variação superior a 10%, o que dificultou a interpretação dos resultados. Testes preliminares no laboratório sugeriram que a baixa repetibilidade dos resultados pode estar ligada às dificuldades de homogeneização deste tipo de polpa (fibrosa).

No caso do mari, os coeficientes de variação entre as triplicatas variaram na faixa de 3-12% e os resultados puderam ser interpretados. O mari apresentou concentração média de tocoferóis de 158 µg/ g de m.s., com proporção de 93,65% de alfa, 5,75% de beta-gama tocoferol e 0,60 de delta-tocoferol. A concentração em tocoferol destes frutos pode ser considerada significativa, pois o consumo de 9 frutos (uma vez que apresentam um baixo rendimento em polpa) conseguem suprir a recomendação diária de vitamina E (15-19 mg/dia).

Quanto a análise espectrofotométrica de determinação de pró-vitamina A, os teores em β-caroteno dos frutos estudados classificou-os como fontes expressivas neste nutriente, pois o consumo de 8 e 3 frutos de inajá e mari, respectivamente são

necessários para suprir a recomendação diária de vitamina A (700 a 900 RE) na dieta humana.

Entre os frutos estudados, o mari foi o que apresentou maior concentração média em β -caroteno (227 $\mu\text{g/g}$ polpa seca).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Identificação de outras frutas amazônicas com potencial em vitamina E e pró-vitamina A;

Quantificação de tocotrienóis na polpa de frutas amazônicas;

Implantação da metodologia de determinação de carotenos por CLAE;

Determinação de outros constituintes importantes nutricionalmente, como por exemplo, ácidos graxos, aminoácidos e minerais, que se fazem presente na composição de frutas amazônicas; e,

Caracterização do óleo extraído da polpa de frutos amazônicos com relação ao teor de tocoferol, verificando o impacto do processo de obtenção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. Review. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.197-216, 2000.
- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBÊLO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, n.10, p.755-758, 1980.
- AOAC (**Association of Official Analytical Chemists**) Official of analysis. 16ed. 3 rev. Washington, 1997.
- AOCS (**American Oil Chemists Society**) Official Methods and Recommended Practices of the American Chemist's Society. 5ed. Champaign, 2002.
- ARAUJO, D.G.; CARVALHO, S.P.; ALVES, R.M. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* WILLD EX SPRENG SCHUM). **Ciência agrotecnica**, Lavras, v.26, n.1, p.13-21, jan./fev., 2002.
- ARRUDA, A.C.; BENTES, M.H.S.; SERRUYA, H. Avaliação quantitativa do teor de beta-caroteno em oleaginosas da Amazônia. **Anais do 3º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia**, p. 243-249, Manaus, maio, 1982.
- ARRUDA, A.C.; ARRUDA, M.S.P.; BENTES, M.H.S.; SERRUYA, H. Quantificação de beta-caroteno em nove espécies vegetais. **Anais do 4º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia**, p.147-154, Belém, dez., 1983.
- BAUERNFEIND, J. C., 1972 **Apud**: RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods-The brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.9, n.28, p.196-230, 1996.
- BENTES, M.H.S.; ARRUDA, A.C.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G.N. Determinação do teor de beta-caroteno em óleos de palmáceas da Amazônia. **Anais do 1º e 2º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia**, p. 327-335, Belém, junho, 1980/ São Luís, junho, 1981.
- BRAMLEY, P.M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H.E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P.J.A.; WAGNER, K.H. Vitamin E. **Journal Science Food Agriculture**, v.80, p.913-938, 2000.
- BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB Journal**, v.13, p.1145-1155, 1999.
- BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C.; MUZZOLI, M.; SACCHETTI, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. **Food Chemistry**, v.77, p.337-341, 2002.
- BURNS, J.; FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. **Phytochemistry**, v.62, p.939-947, 2003.

BURTON, B.T. **Nutrição Humana: manual de nutrição na saúde e na doença**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1979, 606p.

CARLUCCI, G.; MAZZEO, P.; GOVERNATORE, S.D.; GIACOMO, G.D.; DEL RE, G. Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extration. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 87-91, 2001.

CALZAVARA, B.B.G.; SOUZA, J.M.S.; CARVALHO, A.C.F. **Estudos sobre produtos potenciais da Amazônia (primeira fase)**. Sistema Nacional de Planejamento Agrícola. Belém, 1978.

CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Teores de beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. **Brazilian Journal of Food Technology**, n.2, v.6, p.163-169, jul./dez., 2003.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5 ed. Belém: Edições CEJUP, 1991: CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991, 279p.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M.C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. Review. **Journal Chromatography A**, v.881, p.131-148, 2000.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

COLLAKOVA, E.; DELLAPENNA, D. Homogentisate phytyltransferase activity is limitinsfor tocopherol biosynthesis in Arabiopsis. *Plant Physiology*, v.131, p.632-642, febraury, 2003.

COMBS JR., G.F. Vitaminas, p.65-105. In: MAHAN, K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002, 1157p.

COST (Coopération Européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique). **Methods for the determination of vitamins in food**. Edited by BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. Elsevier Applied Science Publishers, London. p. 23-32. 1991.

CUVELIER,C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Ann. Méd. Vét.**, v. 147, p. 315-324, 2003.

DEBIER, C.; KOVACS, C.; LYDERSEN, C.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y. Vitamin E and vitamin A contents, fatty acid profiles, and gross composition of harp and hooded seal milk through lactation. **Can. J. Zool.**, v.77, p.952-958, 1999.

DELGADO-ZAMARRENO, M.M.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.935, p.77-86, 2001.

EVANS, H.M.; BISHOP, K.S., 1922 Apud: EENENNAAM, A.L.V.; LINCOLN, K.; DURRETT, T.P.; VALENTIN, H.E.; SHEWMAKER, C.K.; THORNE, G.M.; JIANG, J.; BASZIS, S.R.; LEVERING, C.K.; AASEN, E.D.; HAO, M.; STEIN, J.C.; NORRIS, S.R.; LAST, R.L. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. **The Plant Cell**, v.15, p.3007-3019. December, 2003.

FERRUZZI, M.G.; SANDER, L.C.; ROCK, C.L.; SCHWARTZ, S.J. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector. **Analytical Biochemistry**, v.256, p.74–81, 1998.

FOOD and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

GABY, S. K.; SINGH, V. N. Apud: GABY, S. K.; BENDICH, A.; SINGH, V. N.; MACHLIN, L. J. **Vitamin Intake and Health**. A Scientific Review. Marcel Dekker, New York, 1991.

HAYNES, J.; McLAUGHLIN, J. **Edible Palms and Their Uses**. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences, nov., 2000, 13p.

HIANE, P.A.; BOGO, D.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M. Carotenóides pró-vitamínicos a e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.23, v.2, p.206-209, maio-ago., 2003.

HIRSCHBERG, J., 1999 Apud: CUVELIER, C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Ann. Méd. Vét.**, v.147, p.315-324, 2003.

HUCK, C.W.; POPP, M.; SCHERZ, H.; BONN, G.K. Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS. **Journal of Chromatographic A**, v.38, p.441–449, 2000.

JANISZOWSKA, W.; PENNOCK, J.F., 1976 Apud: CUVELIER, C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Ann. Méd. Vét.**, v.47, p.315-324, 2003.

KAMAL-ELDIN, A.; GÖRGEN, S.; PETTERSSON, J.; LAMPI, A.M. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.217-227, 2000.

KAY, M.M.B.; BOSMAN, G.J.C.G.M.; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.83, p.2463-2467, 1986.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2ed. Worth Publishers: New York, 1995.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.447-450, jul./set. 2002.

MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives**. Dekker. New York, 1995.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, p.441-445, 1987.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods In: HURST, W.J. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton. London. New York. Washington, D.C., 2002.

MORÓN-VILLARREYES, J.A. Óleos vegetais, p. 9-28 In: FARIA, L.J.G.; COSTA, C.M.L. (coord.). **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: UFPA, NUMA, POEMA, 1998, 302p.: il. – (série POEMA; n 7).

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. 8ed. Atheneu: São Paulo, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Recommended dietary allowances. 10th edition. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989.

NELIS, H.J.; D'HAESE, E.; VERMIS, K. Vitamin E. In: DE LEENHEER, A.P. **Modern chromatography analysis of vitamins**. 3ed, revised and expanded. University of Ghent. Ghent, Belgium. 2000.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. Review. **Journal of Chromatography A**, v.881, p. 543-555, 2000.

OLIVER, J.; PALOU, A.; PONS, A. Semi-quantification of carotenoids by high-performance liquid chromatography: saponification-induced losses in fatty foods. **Journal of Chromatography A**, v.829, p.393-399, 1998.

PALLET, D. **Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos por extrativismo** – colóquio SYAL – Montpellier, outubro de 2002. Cirad Fihor-São Paulo – Brasil, 2002.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3940-3944, 2003.

PENNOCK, J.F.; HEMMING, F.M.; KERR, J.D., 1964 Apud: CUVELIER, C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Ann. Méd. Vét.**, v.147, p.315-324, 2003.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. Oficina gráfica da **Revista da Veterinária**. Belém, 1941.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Biol. Med.**, v.28, p.141-164, 2000.

ROCK, C.L. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacology Theraphy**, v.6, n.3, p.185-197, 1997.

RODAS MENDOZA, B.; PONS, S.M.; CASTELLOTE BARGALLÓ, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. **Journal of Chromatography A**, v.1018, p.197-202, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the Provitamin A Contents of Foods-The Brazilian Experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.9, n.28, p.196–230, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. Study review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.641-647, 2000.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; GIVRON, C.; PASCAL, S.; RIBEIRO, C.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the edible parts of four typical Amazonian fruits: assai, araca, bacuri, cupuaçu. **Journée universitaire de recherche en nutrition**. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique, 3 octobre 1996.

ROZZI, N.L.; SINGH, R.K.; VIERLING, R.A.; WATKINS, B.A. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2638–2643, 2002.

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. Review. **Journal of Chromatography A**, v.935, p.45–69, 2001.

SALO-VAANANEN, P.; OLLILAINEN, V.; MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; SALMELA-MÖLSÄ, E.; PIIRONEN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. **Food Chemistry**, v.71, p. 535-543, 2000.

SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P. High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. **Journal of Chromatography A**, v.976, p.277-284, 2002.

SANDERS, T.A.B. Dietary Fat – Weighing up the Pros and Cons. **Nutrition & Food Science**, v.5, p.9-13, sep./oct., 1994.

SATTLE, S.E.; CHENG, Z.; DELLAPENNA, D. From Arabidopsis to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. **Trends in Plant Science**, v.9, n.8, p.365-367, August, 2004.

SHANLEY, P.; CYMERYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém, 1998. 127p.: il.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. L.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development, 2ed. Wiley Interscience Publication and John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.

TALCOTT, S.T.; HOWARD, D.L.R. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.47, p.2109-2115, 1999.

THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. **Nutrition & Food Science**, v.2, p.58-65, mar./april, 1997.

THRELFALL, D.R., 1971 **Apud:** CUVELIER, C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Ann. Méd. Vét.**, v.147, p.315-324, 2003.

TURNER, C.; MATHIASSEN, L. Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v.870, p.275-283, 2000.

VALLILO, M.I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S.; CAMPOS, N.C.; MOITA NETO, J.M. Lecythis pisonis Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v.66, p.197-200, 1999.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisoras de la Amazonia**. Tratado de cooperacion Amazonica. Secretaria Pro-Tempore. Lima-Peru. junio, 1996.

ZECHMEISTER, L., 1949 **Apud:** RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods-The brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.9, n.28, p.196-230, 1996.