

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

JOSILENE LIMA SERRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEOS E GORDURAS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS: DETERMINAÇÃO DE PRÓ-VITAMINA A E VITAMINA E**

Belém
2011

JOSILENE LIMA SERRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEOS E GORDURAS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS: DETERMINAÇÃO DE PRÓ-VITAMINA A E VITAMINA E**

Dissertação IV apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade
Federal do Pará para obtenção do
Título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Sylvain Darnet

Belém
2011

JOSILENE LIMA SERRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEOS E GORDURAS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS: DETERMINAÇÃO DE PRÓ-VITAMINA A E VITAMINA E**

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Sylvain Darnet

Orientador

Prof^a Dr. Antonio José de Almeida Meirelles

(UNICAMP/ Membro)

Prof^a Dra. Luiza Helena Meller da Silva

(UFPA/ Membro)

Prof^a Dra. Gabriela Alves Macedo

(UNICAMP/ Suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu irmão,

Olga Maria Lima Serra, Jorge Damião Serra e Jorge Damião Serra Júnior

“Um sonho sonhado sozinho é apenas sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”.

Raul Seixas

Amados, este momento só existe porque vocês aceitaram viver esse sonho comigo e torná-lo realidade. A vocês dedico essa vitória, como uma forma singela de agradecê-los pelo incentivo, apoio e seu amor incondicional!

A Daniel Augusto de Oliveira Rocha,

“Amar é sentir na felicidade do outro a própria felicidade”.

Gottfried Wilhelm von Leibnitz

A você meu amor, os meus sinceros agradecimentos, por me apoiar incondicionalmente neste sonho, mesmo durante a minha ausência, a falta de atenção, o olhar longe e o sumisso repentino.

Ao Prof. Dr. Sylvain Henri Darnet

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Sabino

A você, os meus sinceros agradecimentos, por tornar esse momento possível e por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando eu não acreditava.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me iluminar com sua força suprema e me fortalecer permitindo superar todos os obstáculos que muitas vezes me amedrontavam.

Aos meus pais, meu irmão, minha avó Eulália, meus primos: Gil, Fabiana, Victor e Gabriel, meus tios, em especial, **Herbet do Espírito Santos Braga Lima (in memorian)** por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos felizes e tristes da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Sylvain Darnet**, pela amizade, dedicação, profissionalismo e excelente orientação. Obrigada por me ensinar tantas coisas!

Aos Professores, **Dra Luiza Helena Meller da Silva, Dr. Antônio Manoel da Cruz Rodrigues e Dr. Antônio José de Almeida Meirelles**. Por terem disponibilizado os Laboratórios **LAMEFI** e **EXTRAE** para a realização dos experimentos desta pesquisa. Obrigada!

A todos os **Professores da Pós-graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPA**, e aos professores, **Dr. Eduardo, Dra Grabiela Macêdo e Dra Juliana Macêdo**. Pelos ensinamentos transmitidos. Obrigada!

Aos amigos do Laboratório Lamefi e Extrae: **Rebeca, Milena, Lidiane, Cecília, Rafael Vitty, Fabíola Damasceno, Klicia Sampaio, Marina Ansolin, Rodrigo e Simone**. Pela grande ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Mestrado: **Liana, Valena, Stefáno, Rafaelle, Eleda, Rafaela, Diego, Marília, Isabelle, Bruno, Bruna, Natácia, Erla, Jonhatan**. Pelos bons momentos que dividimos.

Aos amigos da Bioinformática: **Elaine, Amanda, Aline, André, Nicolau, Luciana, Jersey**. Por partilharem comigo os momentos difíceis e felizes desta jornada.

Aos amigos: **Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, Prof. Dr. João Elias Moucherek Filho, Dr. André Gustavo, Natanael, Jane, Wellington e Fábio**. Pela amizade, carinho, apoio e atenção.

As empresas **Naturais da Amazônia e Agropalma**. Pela doação das amostras e disponibilização dos laboratórios para realização desta pesquisa.

À **UFPA, a Pós-graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPA e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**. Pelo apoio financeiro e pela oportunidade de aprimoramento.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende com a vida e os humildes”

(Cora Carolina)

RESUMO

Nos últimos anos, tem aumentado a demanda comercial por novas fontes de óleos e gorduras vegetais para consumo doméstico e aplicação no setor industrial. Frutos amazônicos são fontes potenciais de óleos e compostos bioativos, porém, ainda existem poucos estudos sobre a composição química e nutricional das espécies de plantas dessa região. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição química e o conteúdo de compostos bioativos, com ênfase em pró-vitamina A e vitamina E, do óleo de buriti (*Mauritia vinifera*), óleo de pracaxi (*Pentaclethra filamentosa*), manteiga de muru-muru (*Astrocaryum murumuru*) e manteiga de ucuúba (*Virola surinamensis*). Foi realizada uma caracterização físico-química dos óleos e gorduras conforme metodologia preconizada pela American Oil Chemists Society (AOCS). A determinação simultânea de carotenóides e vitamina E foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a detecção foi utilizado um detector de arranjo de diodos (DAD), para os carotenóides, e o detector de fluorescência para os tococromanóis. Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos óleos e gorduras mostraram altos índices de acidez em ambos e elevados índices de peróxido nas gorduras. O ácido oléico foi predominante nos óleos de buriti e pracaxi, enquanto que nas gorduras de muru-muru e ucuúba, os ácidos graxos majoritários foram o ácido mirístico e o ácido láurico, respectivamente. O conteúdo total de tococromanóis encontrados nas amostras variou amplamente de 197 a 1511 ppm, em contrapartida, os carotenóides foram detectados apenas nos óleos. O óleo de buriti apresentou maior conteúdo de vitamina E e carotenóides, sendo considerado uma excelente fonte dessas vitaminas. Os dados indicam que os óleos e gorduras analisados são fontes de baixo custo de antioxidantes naturais (vitamina E e carotenos), ácidos graxos saturados (ácido láurico e mirístico) e insaturados (ácido oléico).

ABSTRACT

In the last years, the commercial demand for new sources of vegetable oil and fat to domestic consumption and industrial application has increased. Amazon fruits are a potential source of oil and bioactive compounds, but there are still few studies on chemical and nutritional composition from plant species of this region. This work explains about the determination of chemical composition and bioactive compounds content, emphasizing the pro vitamin A and vitamin E, in buriti oil (*Mauritia vinifera*), pracaxi oil (*Pentaclethra filamentosa*), muru-muru fat (*Astrocaryum murumuru*) and ucuúba fat (*Virola surinamensis*). The physico-chemical characterization of Amazon fruit oils and fats were performed using American Oil Chemists Society methods. The simultaneous determination of vitamin E and carotenoids was carried by High Performance Liquid Chromatography. The detection was performed, using a PhotoDiode Array for carotenoid and a fluorescence detector for tococromanols. The physico-chemical characterization showed high acidity index for oils and fats, and high peroxide index only for fats. The oleic acid content is higher in buriti and pracaxi oils, while miristic and lauric acids are more abundant in muru-muru and ucuuba fats, respectively. The tococromanols content varies from 197 to 1511 ppm, in another hand carotenoids were only detected in buriti and pracaxi oils. The buriti oil has the highest content of vitamin and carotenoids, being considered a good source of these compounds. These results indicate that the Amazon oils and fats are low cost sources of natural antioxidant, carotenoids and tococromanols, unsaturated fatty acids, oleic acid, and saturated acid, miristic and lauric acid.

LISTA DE ABREVIACÕES

ω : ômega

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

α -TF: α -Tocoferil Fosfato

α -PTT: Proteína transportadora de α -tocoferol

UI: Unidade Internacional

α -TE: α -Tocoferol equivalente

IDR: Ingestão diária recomendada

ERO's: Espécies reativas de oxigênio

KOH: Hidróxido de potássio

NaOH: Hidróxido de sódio

PF: Ponto de fusão

IR: Índice de refração

UV: Ultravioleta

LAMEFI: Laboratório de Medidas Físicas

EXTRA-E: Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio

T: Tocoferol

T3: Tocotrienol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Produção mundial de óleos vegetais	19
FIGURA 2. Estrutura química dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b).....	21
FIGURA 3. Estrutura química do acetato de d,l- α -tocoferil.....	22
FIGURA 4. Mecanismo da atividade antioxidante do α -tocoferol no radical peroxila livre.	23
FIGURA 5. Conteúdo de vitamina E em óleos vegetais (mg/kg).....	25
FIGURA 6. Estrutura química de compostos pertencentes ao grupo das xantofilas (a) e dos carotenos (b).	28
FIGURA 7. Contribuição de vitamina A de algumas fontes alimentícias presentes na dieta da população americana.	32
FIGURA 8. Perfil de ácidos graxos insaturados de frutos amazônicos.....	37
FIGURA 9. Etapas de preparação das amostras.	48
FIGURA 10. Cromatogramas dos padrões de β -caroteno, α -tocoferol (α -T), β -tocoferol (β -T), γ -tocoferol (γ -T) e δ -tocoferol (δ -T) por HPLC.....	55
FIGURA 11. Cromatogramas das análises de vitamina E e carotenóides no óleo de buriti.....	59
FIGURA 12. Cromatogramas das análises de vitamina E e carotenóides no óleo de pracaxi.....	60
FIGURA 13. Cromatograma da análise de vitamina E na gordura de muru-muru. ...	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características de alguns frutos oleaginosos da Amazônia.....	35
TABELA 2. Espécies de frutos amazônicos analisadas nesse estudo.....	43
TABELA 3. Características físico-químicas de gorduras vegetais amazônicas.	52
TABELA 4. Perfil de Ácidos Graxos de gorduras vegetais amazônicas.....	53
TABELA 5. Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) das vitaminas analisadas pelo método aplicado.	56
TABELA 6. Recuperação dos padrões de tocoferóis em amostra óleo de coco.....	57
TABELA 7. Conteúdo de vitamina E em óleos e gorduras vegetais de frutos amazônicos.....	58

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Óleos e gorduras vegetais	18
3.2 Componentes bioativos.....	20
3.2.1 Vitamina E	20
3.2.2.1 Estrutura e biossíntese	20
3.2.2.2 Funções biológicas.....	22
3.2.2.3 Ocorrência e fontes alimentícias	24
3.2.2.4. Deficiência em vitamina E.....	26
3.2.2.5 Ingestão Diária Recomendada	27
3.2.2 Carotenóides	27
3.2.2.1 Estrutura e biossíntese dos carotenoides	27
3.2.2.2 Funções biológicas.....	30
3.2.2.3 Ocorrência e Fontes alimentícias	31
3.2.2.4 Deficiência em vitamina A.....	33
3.2.2.5 Ingestão Diária Recomendada	33
3.3 Oleaginosas da Amazônia.....	34
3.5 Características de qualidade e identidade de óleos e gorduras vegetais.....	38
3.6 Métodos de determinação analítica de vitamina E e pró-vitamina A.....	40
4. MATERIAL E METODOS	43
4.1 Amostras.....	43
4.2 Caracterização físico-química dos óleos e gorduras de frutos amazônicos	44
4.2.1 Determinação do índice de refração	44
4.2.2 Determinação do índice de saponificação	44
4.2.3 Determinação do índice de iodo.....	45
4.2.4 Determinação do índice de peróxido.....	45
4.2.5 Determinação do ponto de fusão	46

4.2.6 Determinação do índice de acidez.....	46
4.2.7 Determinação da cor	47
4.3 Perfil de Ácidos Graxos	47
4.4.1 Preparação das amostras.....	47
4.4.2 Preparo dos padrões de carotenos e tocoferóis	48
4.4.3 Condições cromatográficas.....	49
4.5 Análise estatística	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Caracterização físico-química dos óleos e gorduras de frutos Amazônicos.....	50
5.2 Perfil de ácidos graxos.....	53
5.3 Determinação analítica de vitamina E e carotenos em óleos e gorduras de frutos Amazônicos por HPLC	55
5.3.1 Parâmetros analíticos do método de determinação de vitamina E e carotenos ..	55
5.3.2 Recuperação dos padrões de tocoferóis e β -caroteno	56
5.3.3 Análise quantitativa de vitamina E e carotenos em óleos e gorduras de frutos Amazônicos	57
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS	63
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	74
ANEXOS.....	75
ANEXO A. Biossíntese de tococromanóis em plantas.....	76
ANEXO B. Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenóides.	77
ANEXO C. Protocolo de extração de carotenóides e tococromanóis.	78
ANEXO D. Determinação do Limite de detecção e quantificação.	79
ANEXO E. Cromatogramas da análise de vitamina E na gordura de ucuúba em detector de fluorescência (A) e detector de arranjo de diodos à 292 nm (B), e o cromatograma dos padrões comerciais de tocoferóis à 292 nm (C)	80

1. INTRODUÇÃO

A relação estreita entre a alimentação e saúde tem aumentado a demanda por fontes naturais de compostos bioativos, destacando-se os antioxidantes naturalmente presentes em alimentos, como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007).

Neste contexto destacam-se os óleos vegetais, que são componentes nutricionais importantes na dieta da sociedade moderna, fornecendo energia, ácidos graxos essenciais e especialmente micronutrientes, como a vitamina A, vitamina E, fitoesteróis e outros (FRANKE et al., 2010).

Diversas pesquisas têm relacionado uma dieta rica nesses micronutrientes com a redução de doenças crônicas e degenerativas, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças de pele e outras condições mediadas pela ação de radicais livres (BESTER et al., 2010; BURNS; FRASER; BRAMLEY, 2003; STAHL et al., 2000).

Além do papel nutracêutico, os óleos vegetais apresentam uma ampla aplicação no setor industrial, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticos, oleoquímicas e combustíveis, tendo em vista que muitos componentes presentes neles, em particular, vitamina E, carotenóides e ácidos graxos, conferem propriedades físicas e químicas importantes, tais como, ação antioxidante, emulsificante, emoliente, textura, entre outros, que aumentam o interesse comercial desses produtos (GUNSTONE, 2011).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento global na produção mundial de óleos e gorduras vegetais, os quais têm sido destinados para consumo e aplicação no setor industrial (USDA, 2010). Em virtude disso, a busca por novas fontes de óleos e gorduras vegetais tem sido intensificada.

Frutos tropicais, especialmente frutos da Região Amazônica, têm sido considerados uma fonte potencial de óleos vegetais, devido ao seu alto conteúdo de óleo. Estima-se que em torno de 60% a 80% dos componentes minoritários presentes em óleos de frutos provenientes de palmeiras amazônicas são micronutrientes bioativos (BEREAU et al., 2003; LUBRANO et al., 1994).

A região amazônica tem uma grande diversidade de espécies vegetais, porém ainda existem poucos dados sobre a composição química das espécies conhecidas, além da existência de espécies desconhecidas, as quais podem ser fontes potenciais de micronutrientes e outros compostos de interesse comercial. Dessa

forma, torna-se necessário intensificar os estudos sobre as espécies de frutas tropicais dessa região, bem como, o desenvolvimento de técnicas apropriadas de análise de micronutrientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a composição química e o conteúdo de compostos bioativos, com ênfase em pró-vitamina A e vitamina E, de óleos e gorduras extraídos de frutos da Região Amazônica.

2.2 Específicos

- ✚ Realizar a caracterização físico-química de óleos e gorduras de frutos amazônicos;
- ✚ Determinar o conteúdo de pró-vitamina A e vitamina E em óleos e gorduras de frutos amazônicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

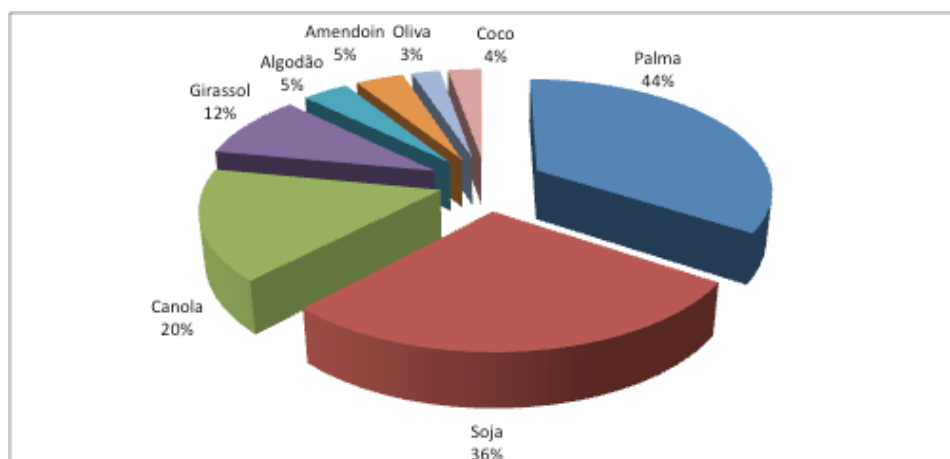
3.1 Óleos e gorduras vegetais

Os óleos e gorduras vegetais são substâncias insolúveis em solventes polares, constituídos predominantemente de triacilgliceróis (>95%) e pequenas quantidades de mono e diacilgliceróis, que são compostos resultantes do processo de esterificação de ácidos graxos e glicerol (GIOIELLI,1996).

A obtenção do óleo e gordura vegetal bruto a partir de matéria-prima vegetal é realizada através de métodos físicos e químicos, sendo a extração por solvente e/ou prensagem as técnicas mais utilizadas. Os óleos extraídos de frutos são obtidos comumente por prensagem, no entanto, dependendo das características do fruto, às vezes são necessários tratamentos prévios dos mesmos, como a secagem (por exemplo, o coco) e esterilização (por exemplo, o fruto de palma), ou em outros casos são necessários a aplicação de condições especiais, como a prensagem à frio (por exemplo, azeitona) para preservar o sabor, aroma e odor peculiares da matéria-prima (O'BRIEN, 2003).

Nesta fase, o óleo vegetal contém impurezas como ácidos graxos livres prejudiciais à qualidade e estabilidade do produto, sendo necessário remover estas impurezas, através de processos de refino. Este processo consiste nas etapas de remoção do solvente, degomagem, branqueamento, desacidificação e desodorização (REDA; CARNEIRO, 2007).

Nos últimos anos, o consumo e a produção mundial de óleos tem aumentado consideravelmente (Figura 1). Entre os óleos vegetais mais produzidos em 2009/10, destacam-se o óleo de palma, com uma produção de 43,9 milhões de toneladas, seguido do óleo de soja (35,7 milhões de toneladas) e canola (20,5 milhões de toneladas). Os maiores produtores de óleos vegetais durante esse período foram a Indonésia e a Malásia, enquanto que o Brasil foi o segundo maior produtor de óleo de sementes (USDA, 2010).



FONTE: Foreign Agricultural Service/USDA , 2009/10.

FIGURA 1. Produção mundial de óleos vegetais.

Do ponto de vista nutricional, os óleos vegetais são as principais fontes de ácidos graxos, especialmente os ácidos graxos essenciais, e vitaminas lipossolúveis, como os carotenóides e a vitamina E (FRANKE et al., 2010).

A maioria dos ácidos graxos saturados e insaturados são biossintetizados pelo organismo humano, com exceção dos ácidos graxos essenciais. Estes últimos encontram-se agrupados na família ômega (ω), incluindo os ácidos graxos ω -9 (por exemplo, o ácido oléico), ω -6 (por exemplo, o ácido linoléico) e ω -3 (por exemplo, o ácido linolênico) (WARD; SINGH, 2005).

Riediger et al. (2009) relataram em uma revisão de literatura vários estudos epidemiológicos sobre a função importante desta família no organismo humano, na redução da fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do colesterol sanguíneo, na prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer, doenças neurológicas, regulação do metabolismo hormonal, entre outros.

Em relação às vitaminas lipossolúveis, especialmente a pró-vitamina A e a vitamina E, estas têm recebido grande atenção quanto às suas funções biológicas, principalmente no que diz respeito à prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, devido à sua ação antioxidante (MOURÃO et al., 2005).

Em virtude dos seus efeitos benéficos à saúde, os óleos vegetais têm sido reconhecidos como alimentos funcionais, constituindo uma parte essencial na dieta da sociedade moderna (BESTER et al., 2010; ANJO, 2004).

3.2 Componentes bioativos

3.2.1 Vitamina E

A vitamina E foi descoberta na década de 1920, como um fator nutricional necessário para reprodução de roedores. Após o isolamento e identificação, essa vitamina foi denominada tocoferol, derivado do grego *tokos* (nascimento), *phero* (trazer) e *ol* (por tratar-se de um álcool) (SCHERF et al., 1996; SALDEEN; SALDEEN, 2005).

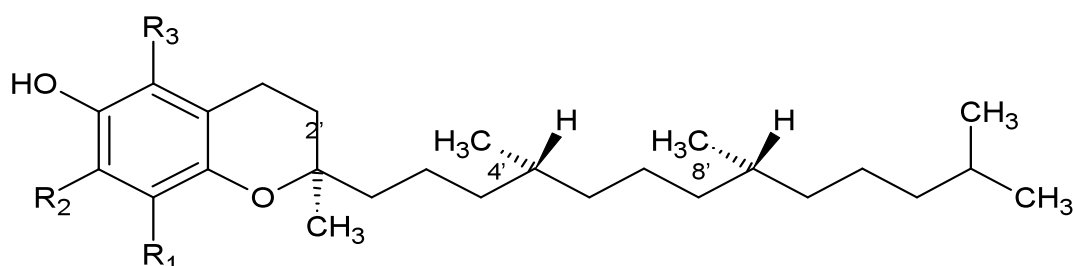
O termo vitamina E é o nome genérico aceito pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1982) que se refere a uma família de oito compostos lipossolúveis classificados em dois grupos, os tocoferóis e os tocotrienóis, denominados coletivamente como tococromanóis (MIYAZAWA et al., 2009).

3.2.2.1 Estrutura e biossíntese

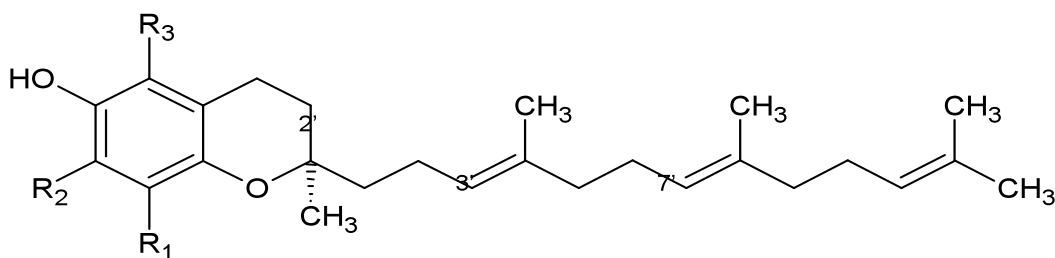
Estruturalmente, os tocoferóis e tocotrienóis caracterizam-se pela presença do anel 6-cromanol ligado a uma cadeia lateral isoprênica com 16 carbonos, os quais diferem entre si pelo número e posição do grupo metila (Figura 2). Variações no grau de metilação do núcleo cromanol originam as formas α -, β -, γ - e δ - tocoferol ou tocotrienol (SCHNEIDER, 2005).

Os tocoferóis diferenciam-se dos tocotrienóis por apresentarem uma cadeia lateral completamente saturada, enquanto que, este último apresenta uma cadeia lateral insaturada com três ligações duplas (SCHNEIDER, 2005). Todos esses oito compostos são encontrados na natureza, contudo apenas o α -, β -, γ -tocoferol e o α -, β -tocotrienol são amplamente distribuídos (COULTATE, 2004).

(a)



(b)



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 2. Estrutura química dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b).

Na estrutura química dos tocoferóis, existem três centros quirais nas posições 2, 4' e 8' que possibilita formar quatro pares de enantiômeros (RRR-SSS; RSR-SRS; RRS-SSR; RSS-SRR) para cada molécula de tocoferol. Entretanto, apenas o isômero RRR-tocoferol (α -tocoferol) é encontrado na natureza, as demais formas são obtidas sinteticamente. (CUVELIER; DOTREPPE; ISTASSE, 2003).

Os tocotrienóis apresentam apenas um centro quiral na posição 2, conseqüentemente, apenas dois estereoisômeros são possíveis (2R e 2S). Em contrapartida, a ocorrência de insaturações nas posições 3 e 7 possibilitam a formação de quatro isômeros geométricos (cis/trans), sendo encontrados naturalmente, em maior quantidade, aqueles isômeros com a configuração 2R-trans/trans (EINTENMILLER; YE; LANDEN, 2008).

A elucidação da rota biossintética da vitamina E em plantas permitiu obter informações sobre as reações de formação e da sua função nesses organismos. Em síntese, duas etapas são essenciais para a formação de tococromanóis, a prenilação do ácido homogentísico, o qual é derivado da tirosina via chimiquato e a etapa subsequente de ciclização (ANEXO A) (MÈNE-SAFFRANÉ; DELLAPENNA,

2010).

O grupo polar presente em ambos os tococromanóis é derivado do metabolismo de aminoácidos aromáticos (tirosina), enquanto que a cadeia alifática dos tocoferóis é originado do fitildisfosfato e dos tocotrienóis do geranylgeranildifosfato, respectivamente (DELLAPENNA; POGSON, 2006).

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 as formas estáveis 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 3, pode-se visualizar a estrutura química do acetato de dl- α -tocoferil.

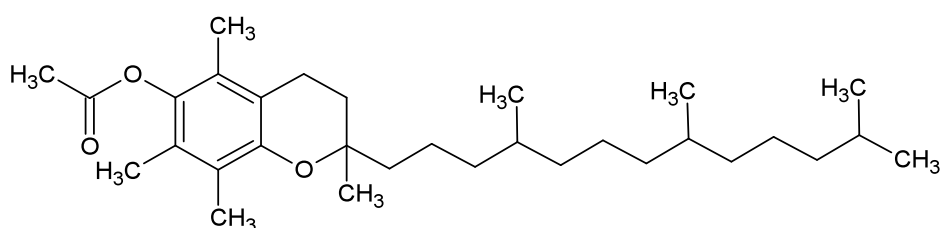


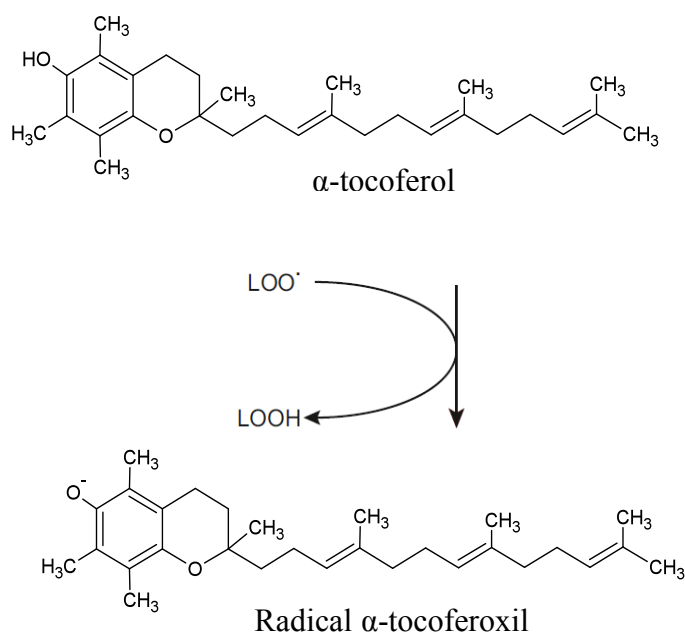
FIGURA 3. Estrutura química do acetato de d,l- α -tocoferil.

3.2.2.2 Funções biológicas

A principal função fisiológica da vitamina E é sua ação antioxidante, sendo considerado como um antioxidante natural tanto em tecidos vegetais como em tecidos de animais (GABY et al.,1991). Em geral, a vitamina E atua como um antioxidante que protege os ácidos graxos polinsaturados contra a peroxidação lipídica (PACKER; WEBER; RIMBACH, 2001).

Essa atividade antioxidante da vitamina E é decorrente da reação direta do tococromanol com compostos reativos, tais como radicais livres, espécies de oxigênio reativas (por exemplo, oxigênio singlete) e espécies reativas de nitrogênio (por exemplo, óxido nítrico). Esse mecanismo de reação envolve basicamente a transferência de um hidrogênio fenólico do anel cromanol para um radical peroxila livre, resultando na formação de um hidroperóxido e um radical tococromanol, que é

mais estável do que o radical hidroxila, em virtude da ressonância eletrônica das ligações duplas do anel cromanol, retardando dessa forma, a propagação em cadeia dos radicais livres (Figura 4) (MENE-SAFFRANÉ; DELLAPENNA, 2010).



FONTE: MENE-SAFFRANÉ; DELLAPENNA, 2010.

FIGURA 4. Mecanismo da atividade antioxidante do α -tocoferol no radical peroxila livre.

Todos os tocoferóis e tocotrienóis apresentam atividade antioxidante, todavia, existem variações dessa atividade dependendo do sistema em que encontram-se essas isoformas. *In vitro*, a ordem da atividade antioxidante entre os tococromanóis permanece praticamente constante (YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 1993).

In vivo, o α -tocoferol apresenta maior atividade de vitamina E, enquanto que, o α -tocotrienol apresenta aproximadamente um terço (1/3) da atividade do α -tocoferol. As outras formas de tococromanóis, não contribuem significativamente com a atividade da vitamina E, pois embora absorvidos, eles não são convertidos em α -tocoferol no organismo humano (TRABER; ATKINSON, 2007).

Essa atividade antioxidante é freqüentemente expressa em termos de tocoferol equivalente, que segue a ordem crescente entre os isômeros α -tocoferol, mg x 1,0; β -tocoferol, mg x 0,5; γ -tocoferol, mg x 0,1; δ -tocoferol, mg x 0,03; α -tocotrienol, mg x 0,3; e β -tocotrienol, mg x 0,05 (INSTITUTE OF MEDICINE,

2000).

Embora, ambos os grupos de tococromanóis, sejam efetivos na inibição de radicais livres, estudos têm sugerido que a ação antioxidante dos tocotrienóis é maior em biomembranas quando comparado com os tocoferóis correspondentes. Os tocotrienóis causam um efeito de desordenamento sobre as biomembranas maior do que os tocoferóis, facilitando a sua distribuição uniforme dentro da membrana (PACKER; WEBER; RIMBACH, 2001).

Em decorrência dessa propriedade antioxidante da vitamina E, o seu consumo tem um papel importante na saúde humana, principalmente na prevenção de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo de células, tais como, aterosclerose, certos tipos de câncer, catarata, distúrbios neurológicos e doenças cardiovasculares (BRIGELIUS-FLOHE; TRABER, 1999; BRAMLEY *et al*, 2000; PRYOR, 2000).

De fato, estudos realizados por Galli *et al.* (2004), demonstraram que o γ -tocoferol e o seu metabolito γ -carboxietilhidroxicromano inibiram a proliferação de células cancerígenas de próstata em torno de 82%, enquanto que, a isoforma α -tocoferol reduziu apenas 41% do crescimento das células.

Segundo Frank (2004) os mecanismos de ação dessa vitamina não estão correlacionados apenas com a sua atividade antioxidante. Vários estudos têm reconhecido atuação da vitamina E na sinalização celular, expressão gênica e na regulação da atividade enzimática (AZZI; STOCKER, 2000; ZINGG, 2007; BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

Recentemente, foi detectado em tecidos biológicos, incluindo o tecido adiposo e hepático, bem como, em vários alimentos, o α -tocoferil fosfato (α -TF), um derivado da vitamina E que era obtido anteriormente apenas sinteticamente (GIANELLO *et al.*, 2005). O α -TF pode atuar como mediador lipídico ativo, modulando a transdução de sinal e expressão de genes, bem como, na prevenção da aterosclerose (ZINGG; MEYDANI; AZZI, 2010).

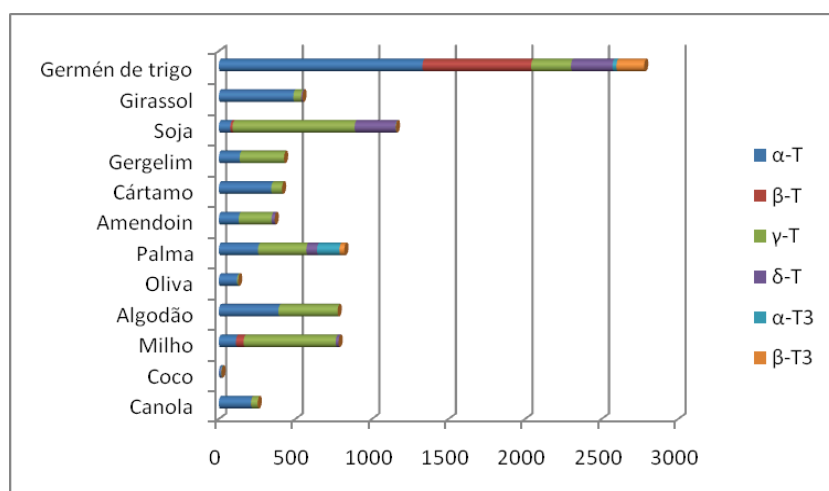
3.2.2.3 Ocorrência e fontes alimentícias

A vitamina E é exclusivamente sintetizada por plantas e organismos fotossintetizantes, por isso é amplamente encontrada em alimentos de origem vegetal. Todavia, a forma do tococromanol difere de acordo com a parte da planta. Nas folhas de plantas, o α -tocoferol é a forma primária tipicamente encontrada, enquanto que, γ -

e δ -tocoferol são comumente encontrados em sementes (DELLAPENNA; POGSON, 2006).

A ocorrência de tocotrienóis em plantas é mais limitada. Estes são encontrados, principalmente, no endosperma de sementes de monocotiledôneas, incluindo vários cereais, como trigo, arroz e cevada, assim como de dicotiledôneas, como algumas espécies da família Apiaceae (HUNTER; CARTON, 2007).

A fonte mais importante de vitamina E na dieta humana são os óleos de sementes de plantas (Figura 5). A maioria dos outros produtos vegetais contribuem com menos de 5 mg/kg (CHING; MOHAMED, 2001).



NOTA: T- Tocoferol;T3-Tocotrienol.

FONTE: BRAMLEY et al., 2000

FIGURA 5. Conteúdo de vitamina E em óleos vegetais (mg/kg).

α - e γ -Tocoferol são as principais formas responsáveis pela atividade da vitamina E em alguns óleos vegetais. Os óleos de girassol e gérmen de trigo são ricos em α -tocoferol, enquanto que os óleos de soja e milho contêm principalmente γ -tocoferol. Já os tocotrienóis são encontrados em grandes quantidades no óleo de palma (BRAMLEY et al., 2000).

Diferentemente das outras vitaminas lipossolúveis, os níveis de vitamina E em fontes alimentícias de origem animal, como fígado, ovos e leite, são baixos, sendo o α -tocoferol a forma predominante. Entretanto, estudos têm detectados os tocotrienóis em carnes e ovos (HEINONEN; PIIRONEN, 1991).

Em alimentos, antioxidantes naturais como os tococromanóis e

carotenóides têm recebido grande destaque recentemente, devido ao seu efeito protetor contra a oxidação lipídica, o que aumenta a vida de prateleira do produto, além de agregar valor nutricional ao mesmo (SEPPANEN et al., 2010).

Óleos vegetais, particularmente os provenientes de sementes, por conterem quantidades apreciáveis de vitamina E apresentam grande resistência à oxidação lipídica. Contudo, durante o processamento dos óleos ocorrem perdas significativas de tocoferóis e tocotrienóis, principalmente durante o refino químico e a desodorização. As maiores perdas de vitamina E são ocasionadas durante a desodorização, em torno de 30 a 60%, e no caso de refino químico com soda cáustica as perdas podem variar de 10 a 30% (O'BRIEN, 2003).

3.2.2.4. Deficiência em vitamina E

A deficiência de vitamina E ocorre raramente em humanos e poucos casos têm sido relatados na literatura sobre os sintomas da deficiência desta vitamina em indivíduos normais.

Em seres humanos, a deficiência de vitamina E está associada a indivíduos acometidos por síndrome de má absorção de lipídios, especialmente, ácidos graxos de cadeia longa e portadores de anomalias genéticas na proteína transportadora de α -tocoferol (α -PTT), devido à ocorrência de mutação no gene α -PTT (TRABER; ATKINSON, 2007).

Dentre os sintomas causados pela deficiência de vitamina E destacam-se a neuropatia, ataxia, miopatia, retinopatia, aumento da fragilidade dos eritrócitos, aumento da produção de etano e pentano (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006). No entanto, é importante destacar que a deficiência de vitamina E pode ser reversível através da suplementação de vitamina E na dieta (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Estudos experimentais realizados em animais indicam que a deficiência de vitamina E na dieta pode causar distrofia muscular, degeneração testicular, lesões neurológicas, anemia e aumento na susceptibilidade a aterosclerose. Em alguns casos clínicos, o efeito desses sintomas foi mais severo com a ausência concomitante de vitamina C e selênio (SCHNEIDER, 2005; SCHERF et al., 1996).

3.2.2.5 Ingestão Diária Recomendada

Em consequência da vitamina E não ser biossintetizada por humanos e animais, a única forma de suprir essa vitamina é através da dieta, principalmente pelo consumo de produtos de origem vegetal (NELIS, D'HAESE e VERMIS, 2000).

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, a forma mais ativa da vitamina E de ocorrência natural, é equivalente à 1,49 UI de vitamina E. A atividade biológica de 1 mg de acetato de d,l- α -tocoferil, a forma sintética da vitamina E comumente utilizada no enriquecimento de alimentos é equivalente à 1 UI de vitamina E (RUPÉREZ et al., 2001).

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).

No Brasil, a RDC n° 269 estabelece para adultos a IDR de 10 mg/dia de α -tocoferol equivalente (α -TE), considerando que 1 mg de d- α -tocoferol corresponde a 1,49 U.I. (BRASIL, 2005a).

3.2.2 Carotenóides

Os carotenóides compreendem a maior classe de pigmentos naturais responsáveis pelas cores vermelho, amarelo e laranja, largamente distribuídos em frutas, flores, raízes e algas, tendo como principais funções o auxílio na fotossíntese e a fotoproteção (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Esses compostos têm sido estudados desde 1831, quando um pigmento responsável pela coloração da cenoura denominado de β -caroteno foi isolado pela primeira vez. Atualmente, estima-se que mais de 700 carotenóides já tenham sido isolados e identificados (BARBOSA-FILHO et al., 2008, MAIANI et al., 2009).

3.2.2.1 Estrutura e biossíntese dos carotenoides

A estrutura básica dos carotenóides consiste de uma cadeia contendo 40 átomos de carbonos, distribuídos em oito unidades isoprenóides, os quais podem ser

acíclicos ou conter um anel com cinco a seis átomos de carbono em uma ou em ambas as extremidades da cadeia. Porém, existem alguns carotenóides que apresentam menos de 40 carbonos em sua estrutura, como os apocarotenos e outros que possuem mais de 40 carbonos (BRITTON, 1995).

Considerando-se a presença ou não de oxigênio em sua estrutura, os carotenóides podem ser classificados em dois grandes grupos, os carotenos, que não contem oxigênio e as xantofilas, que contém oxigênio na sua estrutura. As formas mais freqüentes de grupos oxigenados em carotenóides são os grupos hidroxila (zeaxantina, lactucaxantina), metoxila (esfereidona, espiriloxantina), epóxido (anteroxantina, licopeno-1,2-epóxido), carbonila (capsantina, esferoidenona) e carboxila (norbixantina) (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICÁRIO; HEREDIA, 2007). Na figura 6, estão apresentadas as estruturas de compostos pertencentes a estes grupos.

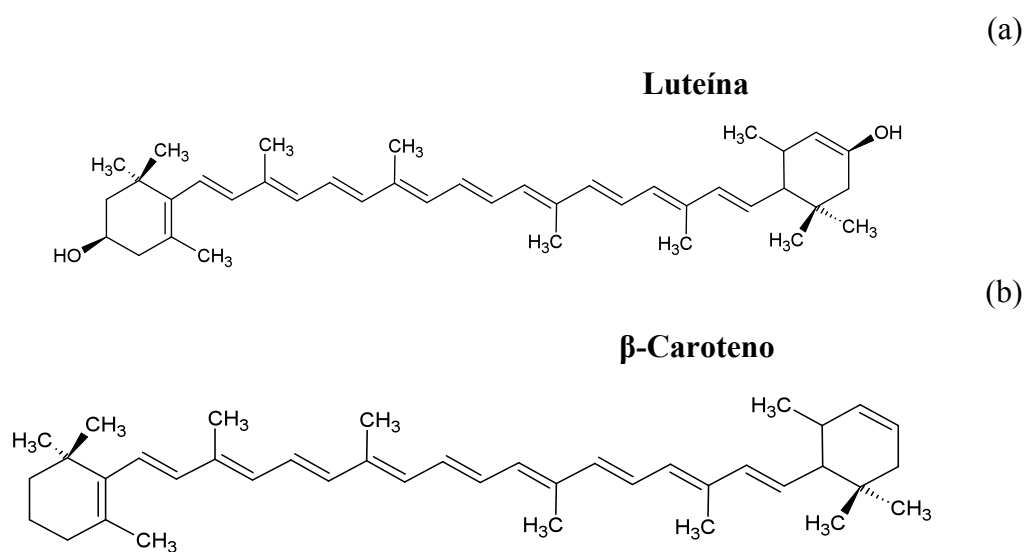


FIGURA 6. Estrutura química de compostos pertencentes ao grupo das xantofilas (a) e dos carotenos (b).

A principal característica dos carotenóides é presença de um sistema de ligações duplas conjugadas, que corresponde ao cromóforo, e que permite a estes compostos absorverem luz na região do visível. A presença destas ligações conjugadas possibilita a ocorrência de uma variedade de isômeros geométricos (cis/trans), sendo a forma trans, naturalmente encontrada na maioria dos carotenóides (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ; PÉREZ-GÁLVEZ, 2002).

No entanto, é importante destacar que esse sistema de duplas conjugadas torna esses compostos mais suscetíveis a oxidação e isomerização à luz, calor, oxigênio, ácido e em alguns casos ao álcali, ocasionando alterações na coloração, biodisponibilidade e perda da atividade provitamínica A (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2001). Dessa forma, essas condições devem ser evitadas durante a realização de análises destes compostos.

A maioria dos carotenóides encontrados naturalmente em frutas e vegetais apresentam uma cadeia carbônica composta por quarenta átomos de carbono. A seqüência da rota biossintética dos carotenóides em plantas esta descrita no ANEXO B, a qual inicia-se com ácido mevalônico e após uma série de reações, formando o geranyl-geranyl difosfato (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

A dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato produz o fitoeno. Subseqüentemente, cada etapa enzimática do fitoeno ao licopeno adiciona uma dupla ligação à molécula, resultando no licopeno, molécula simétrica que contém 13 ligações duplas (PAIVA; RUSSEL, 1999).

As etapas posteriores ao licopeno consistem em sucessivas mudanças estruturais, como a ciclização dos grupos terminais da molécula, produzindo γ -caroteno (contém apenas um anel) e β -caroteno (contém dois anéis aromáticos); e a introdução de grupos oxigenados resultando na formação das xantofilas (MÍNGUEZ-MOSQUERA, HORNERO-MÉNDEZ; PÉREZ-GÁLVEZ, 2002).

Em plantas, a ocorrência de carotenóides é variável dependendo do órgão da planta ou espécie, devido a fatores ambientais e genéticos. Em tecidos fotossintéticos, os carotenóides localizam-se nos cloroplastos e a composição é similar para a maioria das plantas, tendo como componentes principais, o β -caroteno, α -caroteno, luteína, zeaxantina, neoxantina e violaxantina, acumulando-se invariavelmente em caules e folhas (BRITTON; KHACHIK, 2009).

Nos tecidos não fotossintetizantes os carotenóides encontram-se na forma cristalina nos cromoplastos, onde são responsáveis pela cor de muitas flores e frutos. A sua composição nesses tecidos é bastante distinta, dependendo da espécie da planta. Por exemplo, o licopeno, é acumulado em grandes quantidades no fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate), enquanto que, a bixina, é acumulada apenas em sementes de *Bixa orellana* (urucum) (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

3.2.2.2 Funções biológicas

Os carotenóides, além de sua contribuição na coloração de frutas e verduras, desempenham um papel importante na dieta humana, tanto a nível fisiológico como dietético, devido a alguns carotenóides atuarem como precursores da vitamina A, o que lhes confere uma atividade de pró-vitamina A (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICÁRIO; HEREDIA, 2007).

A principal função fisiológica dos carotenóides é a sua capacidade como precursor da vitamina A. No entanto, o carotenóide para ser um precursor da pró-vitamina A, deve possuir pelo menos um anel de β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica contendo no mínimo 11 carbonos (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006).

De mais de 700 carotenóides conhecidos, aproximadamente 50 apresentam atividade de pró-vitamina A, dos quais apenas 14 carotenóides são biodisponíveis. Entre esses destacam-se o β -caroteno, o α -caroteno, a luteína, a zeaxantina, licopeno e β -criptoxantina, mais encontrados em plasma sanguíneo humano (KHACHIK; BEECHER; GOLI, 1991; NAKAGAWA et al., 2008).

Entre os carotenóides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade de vitamina A, por originar, a partir da ruptura enzimática de sua estrutura, duas moléculas de vitamina A. No entanto, ensaios *in vitro* realizados 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; PÉREZ-GÁLVEZ, 2002).

Várias pesquisas indicam que a atividade de pró-vitamina A de alguns carotenóides tem aplicações importantes tanto na prevenção de certas doenças, devido às suas funções biológicas, como na estimulação da resposta imune em diferentes níveis e na atividade antioxidante (OLIVER; PALOU, 2000; CAMPOS et al., 2003).

Os efeitos protetores dos carotenóides têm sido amplamente reconhecidos na prevenção e no tratamento de doenças oftalmológicas. Pigmentos carotenóides, como a luteína e a zeaxantina, são responsáveis pela coloração da íris e proteção da retina contra danos fotoxidativos (BERNSTEIN et al., 2001).

Os carotenóides atuam também no organismo humano eficientemente no sistema de defesa antioxidante, protegendo os componentes lipofílicos presentes nas

células, tais como, proteínas, fosfolípidos, glicoproteínas e glicolípidos membranares da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), moléculas oxigenadas altamente reativas, especialmente, o oxigênio singlete e radicais peróxidos, gerados durante processos fotooxidativos (STAHL; SIES, 2003).

Dessa forma, visto que as ERO's são metabólitos fisiológicos inevitáveis no organismo humano e que são responsáveis pelas lesões oxidativas e genéticas que contribuem para o desenvolvimento do câncer acredita-se que a incorporação de alimentos ricos em carotenóides pode reduzir o risco de câncer (GOMES, 2007; NISHINO et al., 2009).

Kotake-Nara et al. (2001) investigaram o potencial de 15 tipos de carotenóides presentes naturalmente em alimentos, de inibir a proliferação de células de câncer de próstata, *in vitro*. Eles observaram que a neoxantina extraída do espinafre, em uma concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ reduziu significativamente a viabilidade dessas células para 15%, em 72 horas.

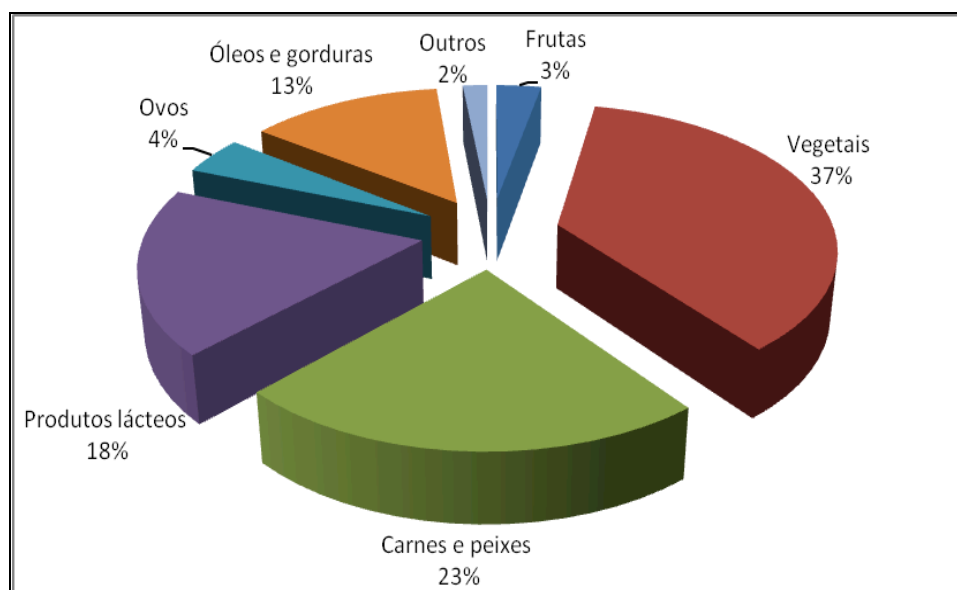
Alguns estudos mostram que a ação antioxidante dos carotenóides pode ser maior quando em sinergia com a vitamina E e vitamina C. Stahl et al. (2000) sugerem que a suplementação de carotenóides e tocoferóis na dieta, pode prevenir e proteger a pele contra estresses fotooxidativos provocadas pela radiação ultravioleta.

Segundo Bohm et al. (1997), esse efeito sinérgico observado na proteção celular contra oxidação, pode estar relacionado ao fato de que somente o β -caroteno não é suficiente para bloquear a ação das ERO's, dessa forma, o radical α -tococromanol atua complementando a atividade antioxidante do β -caroteno.

3.2.2.3 Ocorrência e Fontes alimentícias

Os carotenóides são comumente encontrados em produtos de origem vegetal, visto que, animais e humanos não são bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e / ou converter precursores que obtêm da dieta (por exemplo, conversão de β -caroteno em vitamina A) (FONTANA et al., 2000).

De acordo com dados do IOM (2000), na dieta da população americana, aproximadamente 40% da vitamina A é derivada de carotenóides provenientes de vegetais e frutas, enquanto que o restante pode ser obtido a partir de carnes, produtos lácteos, ovo, óleos, gorduras, entre outros (Figura 7).



Fonte: INSTITUTE OF MEDICINE (2000).

FIGURA 7. Contribuição de vitamina A de algumas fontes alimentícias presentes na dieta da população americana.

Em alimentos vegetais, os carotenóides mais importantes são o β -caroteno, α -caroteno (cenoura; *Daucus carota*), β -criptoxantina (caqui; *Diospyros kaki*), licopeno (tomate; *Lycopersicon esculentum*) e luteína (Taioba; *Xanthosoma spp*), pois representam mais de 95% dos carotenóides presentes no plasma sanguíneo, sendo o β -caroteno a forma mais biodisponível (RODRIGUES-AMAYA et al., 2008; MAIANI et al., 2009). Entretanto, de acordo com estudos recentes realizados por Burri et al. (2010), o consumo de alimentos ricos em β -criptoxantina podem ser fontes melhores de pró-vitamina A do que o β -caroteno, visto que a sua biodisponibilidade no sangue é maior do que o β -caroteno.

No entanto, o conteúdo de carotenóide nos frutos depende da espécie, variedade, safra e grau de maturação (OLIVER; PALOU; 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; LIMA, 2002).

A biodisponibilidade dos carotenóides pode ser influenciada por vários fatores, tais como, as características da fonte alimentícia, a sua interação com outros componentes do alimento, o tamanho da partícula, a sua localização em organelas celulares da planta (cloroplasto ou cromoplasto) e a presença de compostos do próprio

alimento que podem interferir na formação das micelas (por exemplo, pectina e fibras). Esses fatores podem alterar a passagem dos carotenóides pelo intestino, assim como, na sua absorção (PAIVA; RUSSEL, 1999).

O processamento e a homogeneização dos alimentos podem aumentar a biodisponibilidade dos carotenóides, fato que se deve provavelmente a redução do tamanho do alimento, rompimento das estruturas celulares e/ou a uma desnaturação mais eficiente dos complexos carotenóide-proteína (KHACHIK et al., 1992; STAHL; SIES, 1992). De fato, recentemente Aherne et al., (2010) observaram que os isômeros trans de carotenóides em purê de cenoura (200 μ g/100g) foram dez vezes mais biodisponíveis do que os isômeros presentes em cenouras *in natura* (20 μ g/100g).

Segundo Campos e Rosado (2005) a absorção de carotenóides concentrados em óleo é maior que a absorção de carotenóides presentes em alimentos e em combinações de alimentos em uma dieta mista, quando comparado a vegetais e frutas *in natura*.

3.2.2.4 Deficiência em vitamina A

A deficiência em vitamina A é uma das principais causas da xerofthalmia, cegueira, morbidade e mortalidade de muitas crianças de países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006).

Nos países em desenvolvimento, embora a principal fonte de vitamina A seja proveniente de frutas, verduras e legumes, que são fontes naturais ricas em carotenóides, ainda prevalecem casos de deficiência dessa vitamina em crianças, o qual está associado, principalmente, ao desmame precoce, a baixa biodisponibilidade da pró-vitamina A de carotenóides nos alimentos, má nutrição e anemia (SEMBA et al., 2010).

3.2.2.5 Ingestão Diária Recomendada

Em virtude dos novos dados sobre a biodisponibilidade da pró-vitamina A provenientes de carotenóides de vários alimentos, os fatores de conversão de vitamina A atuais são superiores às antigas recomendações, em que 1 equivalente de atividade de retinol corresponde a 1 μ g de retinol ou 12 μ g de β -caroteno ou 24 μ g de outros carotenóides precursores de vitamina A, o que indica que estes são menos

biodisponíveis em alguns alimentos, como por exemplo os vegetais (CAMPOS; ROSADO, 2005).

Com base nisso, a ingestão diária recomendada pela RDC nº 269 é de 600µg para adultos, 800µg para gestantes, 850µg para lactantes e 500µg para crianças (7-10 anos) (BRASIL, 2005a).

3.3 Oleaginosas da Amazônia

O Brasil, em virtude da sua biodiversidade florística, apresenta uma grande riqueza em plantas oleaginosas, principalmente na região amazônica. Estima-se que nessa região existam mais 100 espécies de plantas oleaginosas, das quais mais da metade são palmeiras (PESCE, 2009; MAMBRIM; BARRERA-ARELLANO; 1997).

Dentre estas espécies de plantas oleaginosas destacam-se o muru-muru (*Astrocaryum mururu*), buriti (*Mauritia flexuosa*), pracaxi (*Pentaclethra filamentosa*) e ucuúba (*Virola surinamensis*) que são frutos tradicionalmente utilizados pela população local, tanto para consumo como na medicina popular (PESCE, 2009). A tabela 1 apresenta as principais características desses frutos.

TABELA 1. Características de alguns frutos oleaginosos da Amazônia.

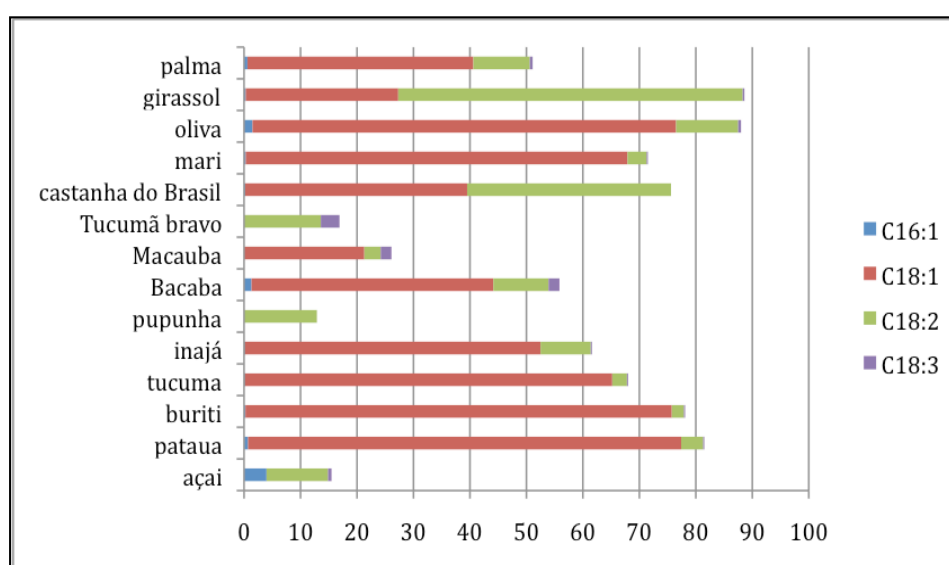
Família	Nome científico/ Popular	Distribuição	Produção	Descrição botânica	Usos
Arecaceae	<i>Mauritia vinifera</i> / Buriti	Região Amazônica, Norte da América do Sul, Nordeste e Centro-Sul do Brasil	60 a 70 mil toneladas/ ano	É uma espécie dióica, possui de 30 a 50 centímetros de diâmetro e de 20 a 35 metros de altura.	Polpa: vinho, sorvetes e doces Óleo: fins alimentícios, produção de cosméticos e combustível. Sementes: confecção de produtos artesanais
Arecaceae	<i>Astrocaryum murumuru</i> / Muru-muru	Região Amazônica	5 a 6 mil toneladas/ ano	Palmeira de médio porte, possui de 1,5 a 15 metros de altura. Os frutos são amarelados, com pêlos marrons ou com espinhos pretos e curtos	Mesocarpo e amêndoa são comestíveis Amêndoa: produção de gordura vegetal Madeira: Construções de casas Farelo da semente: produção de alimentos para animais
Myristicaceae	<i>Virola surinamensis</i> / Ucuúba-branca	Região Amazônica e nordeste do Brasil	-	Árvore de porte médio, podendo chegar a até 35 m de altura; tronco de 60-90 cm de diâmetro com casca grossa, contendo ramos carregados de folhas pecioladas, oblongolanceoladas, com até 20 cm de comprimento; inflorescências em panículas axilares e fruto elipsóide bivalvar.	Amêndoa: produção de gordura (velas e sabão); Madeira: fabricação de laminados e compensados; Folhas e casca: aplicação medicinal (inflamações e febres); Farelo da semente: produção de alimentos para animais

Fabaceae	<i>Pentaclethra filamentosa/</i> Pracaxi	Região Amazônica, regiões da América Central e América do Sul	-	Árvore de porte médio, suas flores formam um penacho branco, seu fruto é uma vagem de 20-25 cm de comprimento, encurvada, de coloração verde	Amêndoa: produção de óleo comestível; Folhas: Aplicação medicinal (atividade antimicrobiana, antilarvívica, antihemolítica) Madeira: produção de combustível Farelo da semente: produção de alimentos para animais
----------	--	--	---	--	--

FONTES: PESCE, 2009; STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; JANICK, PAULL, 2006; SHALEY, MEDINA, 2005.

Frutos da região Amazônica são fontes potenciais de óleos vegetais, devido ao seu alto conteúdo de óleo, em média mais 61% dos ácidos graxos da maioria dos óleos de frutos amazônicos são compostos de ácidos graxos insaturados, carotenos e tocoferóis (BEREAU et al., 2003; LUBRANO et al., 1994).

Em relação ao perfil de ácidos graxos de frutos amazônicos, estudos têm revelado que eles apresentam um elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados (>60%), o qual é particularmente elevado no patauá, buriti, tucumã, inajá, mari e castanha-do-Brasil. Os ácidos graxos monoinsaturados são mais predominantes do que os polinsaturados nesses frutos, sendo o ácido oléico o mais abundante. Comparado a óleos vegetais comercialmente conhecidos, como o óleo de oliva, palma e girassol, o conteúdo deste ácido graxo encontrado no patauá e buriti são similares (Figura 8).



FONTES: CHUNHIENG et al., 2008; RODRIGUES et al. (2010); LUBRANO et al. (1994); BERAU et al. (2003); NASCIMENTO et al. (2008).

FIGURA 8. Perfil de ácidos graxos insaturados de frutos amazônicos.

A distribuição das isoformas dos tococromanois em espécies frutíferas da Amazônia varia amplamente de fruto para fruto. Em geral, estudos têm demonstrado que o mesocarpo contém grandes quantidades desta vitamina, sendo o patauá (*Jessenia bataua*) e o buriti (*Mauritia flexuosa*) as maiores fontes encontradas em frutos amazônicos desta vitamina até o presente momento. As principais isoformas encontradas nesses frutos são α -, β -, γ -tocopherol e δ -tocotrienol. A semente do cupuí

(*Theobroma subincanum*) também é uma excelente fonte de vitamina E, sendo o α -(>500 ppm) e γ -tocopherol (>1700 ppm) os isômeros predominantes (RODRIGUES et al., 2010; DARNET et al., 2011; COSTA et al., 2010; BEREAU et al., 2003; BRUNI et al., 2002; LUBRANO et al., 1994).

O perfil de ácidos graxos insaturados presentes em frutos amazônicos tem sido intimamente relacionado com o conteúdo dos tococromanóis, tendo em vista que eles oferecem excelente proteção contra a peroxidação lipídica durante a fotossíntese (KAMAL-ELDIN; ANDERSSON, 1997).

Outro componente minoritário também encontrado em quantidades apreciáveis nos frutos amazônicos são os carotenóides. Rosso e Mercadante (2007) identificaram cerca de 60 carotenóides em seis frutos nativos da região amazônica, entre eles o buriti (*Mauritia vinifera*), abricó (*Mammea americana*), mari (*Geoffroia striata*), pupunha (*Bactrys gasipaes*), camapú (*Physalis angulata*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), destacando-se o buriti como a maior fonte de pró-vitamina A (7280 RE/ 100g).

As espécies vegetais da Amazônia têm um enorme potencial industrial e medicinal, possuindo diversas aplicações nos setores industriais, alimentício, produção de combustíveis alternativos ao diesel, na indústria de medicamentos e cosméticos (ALMEIDA; ROCHA FILHO; ZOGHBI, 2009).

3.5 Características de qualidade e identidade de óleos e gorduras vegetais

As propriedades químicas e físicas de óleos e gorduras são largamente determinadas pelo perfil de ácidos graxos que eles contem e sua posição dentro das moléculas de triacilglicerídeos. Por isso, a caracterização de óleos e gorduras é importante para determinar o conteúdo e tipo de lipídeos presentes nessas amostras (O'BRIEN, 2004).

Tal caracterização permite obter informações sobre o valor calórico, bem como outras propriedades, incluindo qualidade nutricional e a segurança dos lipídeos, quanto ao conteúdo de colesterol e conteúdo de lipídeos saturados (SHAHIDI, WANASUNDARA, 2008).

A legislação brasileira vigente utiliza dois parâmetros para caracterizar óleos vegetais, que são as características de qualidade, as quais incluem as análises de índice de acidez, ponto de fumaça, índice de peróxidos, impurezas insolúveis,

umidade e material volátil; e identidade que incluem: matéria insaponificável, densidade relativa, índice de refração, índice de saponificação, índice de iodo e ácidos graxos (BRASIL, 2005b). Neste estudo, foram realizadas análises preconizadas em ambos os parâmetros, que são descritas a seguir.

a) Índice de acidez: A acidez de um óleo ou gordura geralmente reflete a quantidade de ácidos graxos hidrolisados dos triacilgliceróis. Portanto, o índice de acidez consiste em medir a quantidade de um álcali, necessário para neutralizar ácidos graxos livres. Os álcalis mais utilizados são o hidróxido de potássio (KOH) e sódio (NaOH). O índice de acidez é comumente expresso em termos de ácido oléico em óleos vegetais. Elevados índices de acidez podem ser indicativos de degradação por rancidez hidrolítica (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

b) Índice de peróxido: Consiste em medir produtos resultantes da oxidação lipídica dos ácidos graxos presentes na amostra, tais como, peróxidos, hidroperóxidos e outros produtos semelhantes. Este é definido como a quantidade de miliequivalentes de peróxido por kilograma de amostra. Índices de peróxidos > 20 correspondem a um óleo ou gordura de baixa qualidade, o qual deve apresentar odores desagradáveis. No óleo de soja, índices de peróxido de 1-5, 5-10 e >10 correspondem a baixo, médio e altos níveis de oxidação, respectivamente (AOCS, método Cg 3-91) (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

c) Índice de iodo: Consiste em medir o grau de insaturação, sendo baseado no número de ligações duplas em relação à quantidade de óleo ou gordura. Dessa forma, este parâmetro é definido como a quantidade de gramas de iodo absorvida a cada 100 gramas de amostra. É comum determinar o índice de iodo calculado da composição de ácidos graxos conforme recomendação da AOCS (método Cd 1c-85) (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

d) Índice de saponificação: Consiste no tratamento da amostra com um álcali forte, geralmente KOH, resultando na clivagem da molécula de triacilglicerol presente no óleo ou gordura em glicerol e ácidos graxos. Este é expresso como a quantidade de KOH requerido para saponificar 1 grama de amostra. É comum a prática de determinar o índice de saponificação calculado da composição de ácidos graxos

conforme recomendação da AOCS (método Cd 3a-94.) (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

e) Cor: Dois métodos têm sido aplicados na análise de cor em óleos e gorduras, o método Lovinbond e o método espectrofotométrico, contudo, o primeiro método é o mais utilizado. Neste método, o óleo é colocado em uma cubeta de vidro padronizada e comparado visualmente com as cores vermelho, azul, amarelo e padrões de cores neutras. Os resultados são expressos em termos dos números associados aos padrões de cor descritos na AOCS (método Cc 13e-92) (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

f) Ponto de fusão (PF): Este parâmetro é uma propriedade importante para definir digestibilidade e aplicabilidade de óleos e gorduras na formulação de muitos produtos alimentícios. O PF depende primariamente do perfil de ácidos graxos presentes na amostra, como comprimento da cadeia, grau de insaturação, conteúdo de ácidos graxos trans e sua posição nos triacilgliceróis (HOAGLAND, SNIDER, 1942; TAN, MAN, 2002). O método de tubo capilar é mais rotineiramente utilizado em laboratórios e recomendado pela AOCS (método Cc 1-25). Esse método consiste em determinar a temperatura, na qual a gordura torna-se totalmente clara e líquida (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

g) Índice de refração (IR): Este parâmetro visa determinar a quantidade de saturação de óleos e gorduras vegetais; o qual decresce linearmente com o índice de iodo. O índice de refração também é utilizado como uma medida de pureza e identificação de substâncias que apresentam um IR característico. Contudo, alguns fatores podem interferir na quantificação deste parâmetro, tais como, conteúdo de ácidos graxos, oxidação e aquecimento do óleo ou gordura. Por exemplo, um lipídeo relativamente saturado como o óleo de coco ($n = 1,448 - 1,450$) tem um IR diferente comparado a um relativamente insaturado como o óleo de girassol ($1,467 - 1,469$) (O'KEEFE, PIKE, 2010; AOCS, 2005).

3.6 Métodos de determinação analítica de vitamina E e pró-vitamina A

Várias metodologias tem sido empregadas na análise individual de

vitamina E e carotenóides em alimentos, entre estes incluem-se os métodos colorimétricos, espectrofotométricos, espectrofluorométricos, polarimétricos e cromatográficos (EITENMILLER; YE; LANDEN, 2008).

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados, devido à precisão, sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados. Entre esses métodos, destacam-se a cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performace Liquid Cromatography*-HPLC) é a técnica recomendada pela AOCS (1998) para identificação e quantificação de vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) em óleos vegetais e pela AOAC (2005) para quantificação de β -caroteno em alimentos. Este método é vantajoso, pois pode ser executado à temperatura ambiente e sem requerer a derivação dos analitos (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

Procedimentos de extração são comumente utilizados para a extração de pró-vitamina A e vitamina E de amostras de alimentos, os mais aplicados são saponificação e extração direta com solvente. A extração direta com solvente é mais recomendado do que a saponificação, em virtude, do tempo de análise, baixo custo com o solvente e menor degradação do analito (EITENMILLER; YE; LANDEN, 2008).

A saponificação é frequentemente empregada para remover lipídios, clorofilas e promover a esterificação das xantofilas. Entretanto, o emprego desse método tem implicado em perdas significantes de carotenos, especialmente os epoxi-carotenóides e xantofilas (PUSPITASARI-NIENABER et al., 2002). Os tocoferóis e tocotrienóis também estão sujeitos a perdas durante esse procedimento de extração. De acordo com Ryynanem et al. (2004) essas perdas deve-se principalmente a instabilidade destes compostos sob as condições alcalinas da saponificação.

Ye, Landen e Eitenmiller (2001) ao analisarem os procedimentos de extração com solvente e saponificação para extrair simultaneamente a vitamina E e β -caroteno de maionese, observaram que o conteúdo de β -caroteno e α -tocoferol foi em torno de 25% maior pela extração direta do que pela saponificação.

Os carotenóides e a vitamina E são moléculas relativamente apolares, embora a maioria das moléculas presentes em ambos apresente pelo menos um grupo polar, fato que permite que as mesmas sejam analisadas por HPLC utilizando tanto colunas de fase normal como de fase reversa (GIMENO et al., 2000;

GLISZCZYNSKA- SWIGŁO; SIKORSKA, 2004).

A coluna de fase normal apresenta vantagens sobre a de fase reversa por apresentar melhor poder de separação dos isômeros β - e γ -tocoferol e tocotrienol, pela maior estabilidade as condições ácidas e alcalinas, além de possibilitar a injeção direta de amostras de óleo, fato que reduz as perdas de vitaminas labéis às condições de tratamento da amostra (RAMADAN; MÖRSEL, 2002).

Os solventes mais utilizados sob condições cromatográficas de fase normal são o hexano e alguns alcoóis, como o isopropanol, sendo o uso deste último preferível por ser mais eficiente na extração de compostos não-glicerídios, devido à sua alta polaridade, além de não ser tóxico e mais seguro ao ambiente (OTHMAN et al., 2010).

Em óleos, esses analitos quando analisados por cromatografia líquida em fase normal, a análise é geralmente realizada por diluição direta da amostra em hexano ou na fase móvel, tendo em vista a afinidade da amostra com a fase móvel (PSOMIADOU; TSIMIDOU, 2002).

De acordo com Gimeno et al. (2000) a determinação simultânea de α -tocoferol e β -caroteno em óleo de oliva em condições cromatográficas de fase reversa utilizando a saponificação demonstrou ser um método rápido, o qual foi realizado em menos de 8 minutos e preciso, tendo um desvio padrão de 4,44% para o β -caroteno e de 4,27% para α -tocoferol. No entanto, segundo esses autores a aplicação de alguns cuidados durante a saponificação, tais como a adição de antioxidantes (ácido ascórbico) e proteção do material à incidência de luz foi primordial para evitar perdas das vitaminas lipossolúveis.





Vários detectores tem sido utilizados para a detecção de vitamina E e carotenóides acoplados ao HPLC, tais como, detector de absorbância ultravioleta (UV), detector de fluorescência, e detector eletroquímico (MONDE et al. 2009; ABIDI, 2003). Todavia, a detecção simultânea dessas vitaminas é realizada comumente utilizando o detector de arranjo de diodos ou um sistema de detectores em série (detector de fluorescência e detector UV), em virtude das diferenças nas propriedades de absorção da luz e fluorescência dos analitos. O β -caroteno não emite fluorescência, porém, apresenta uma forte absorção à 450nm, enquanto que, os tocoferóis absorvem luz fracamente na região UV (292 a 298 nm, em etanol). Entretanto, os tocoferóis emitem uma forte fluorescência, devido a presença do anel cromanol em sua estrutura (YE; LANDEN; EINTENMILLER, 2001).

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Amostras

Foram selecionados quatro óleos e gorduras vegetais extraídos de diferentes espécies de frutos da Região Amazônica (Tabela 1). Os óleos e gorduras vegetais analisados nesse estudo foram doados pela Empresa Naturais da Amazônia, os quais foram extraídos por prensagem a frio e acondicionados em embalagens plásticas. As amostras estavam dentro do prazo de validade e todas eram provenientes de reservas extrativistas da região amazônica.

TABELA 2. Espécies de frutos amazônicos analisadas nesse estudo.

Fruto	Nome científico/ popular	Tipo de amostra
	Buriti/ <i>Mauritia vinifera</i>	Óleo vegetal
	Pracaxi/ <i>Pentaclethra filamentosa</i>	Óleo vegetal
	Ucuúba/ <i>Virola surinamensis</i>	Gordura vegetal
	Muru muru/ <i>Astrocaryum murumuru</i>	Gordura vegetal

FONTE: Beraca, 2011.

4.2 Caracterização físico-química dos óleos e gorduras de frutos amazônicos

A caracterização físico-química dos óleos vegetais foi realizada no laboratório de Controle de Qualidade da Agropalma e no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI) da Universidade Federal do Pará, utilizando as metodologias preconizadas pela American Oil Chemists Society (AOCS, 2005). Foram realizadas as seguintes análises:

4.2.1 Determinação do índice de refração

Foi determinado utilizando o refratômetro de ABBE, Q-767B da série RR 01 ajustado com água destilada à temperatura de 25°C, conforme o método Cc 7-25 (AOCS).

4.2.2 Determinação do índice de saponificação

Pesou-se alíquotas de 4-5 g de óleo em um erlenmeyer e adicionou-se 50mL do hidróxido de potássio alcoólico. Paralelamente preparou-se um branco nas mesmas condições de análise da amostra. Conectaram-se os erlenmeyers a condensadores, sobre aquecimento por aproximadamente 1 hora até as amostras completarem a reação de saponificação.

Após a saponificação, aguardou-se o resfriamento deste sistema e efetuou-se a lavagem do interior dos condensadores com uma pequena alíquota de água destilada. Adicionou-se cerca de 1 mL de fenolftaleína e titulou-se com HCl 0,5 N até a coloração rósea desaparecer (AOCS, Cd 3 -25). O índice de saponificação foi calculado com base na equação 1.

$$\text{Índice de saponificação} = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) \times N}{M_{\text{amostra}}} \times 56,1 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V_{branco} = volume em mL de HCl gasto na titulação do branco

V_{amostra} = volume em mL de HCl gasto na titulação da amostra

M_{amostra} = Massa da amostra em gramas

N = normalidade da solução de HCl

4.2.3 Determinação do índice de iodo

Inicialmente, flitrou-se as amostras para retirada de qualquer impureza e em seguida pesou-se 0,5 a 0,8 g da amostra em erlenmeyer de 500 mL. Adicionou-se 15 mL de tetracloreto de carbono à amostra e homogenizou-se até completa dissolução. Adicionou-se 25 mL do reagente de Wijs e homogenizou-se novamente. Os frascos com as amostras foram armazenados durante o período de reação (30 minutos) em ambiente com ausência de luz a uma temperatura de 25°C. Após isso, adicionou-se 20 mL de solução de iodeto de potássio (KI) e de 100 mL de água destilada.

Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 0,1 N, com agitação constante até que a cor amarela se dissipasse. Adicionou-se 1 a 2 mL da solução indicadora de amido e continuou-se a titulação até que a coloração azul desaparecesse (AOCS, Cd 1– 25). Os cálculos do índice de iodo foram feitos com base na equação 2, o qual foi expresso em números de centigramas de iodo absorvido por 1,0 g da amostra (% de iodo absorvido).

$$\text{Índice de iodo} = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) \times N \times 12,69}{M_{\text{amostra}} \text{ (g)}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

V_{branco} = volume em mL de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco

V_{amostra} = volume em mL de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra

M_{amostra} = Massa da amostra em gramas

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

4.2.4 Determinação do índice de peróxido

Pesou-se 5 g da amostra em um erlenmeyer, posteriormente, foram adicionados 50 mL da solução de isooctano e ácido acético, e agitou-se até completa dissolução. Adicionou-se 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturada e 30 mL de água, agitou-se durante um minuto. Titulou-se com solução 0,1N padronizada de tiosulfato de sódio até a cor amarela quase desaparecer e adicionou-se 0,5 mL de

solução de amido 1%, continuando a titulação até a cor azul desaparecer (AOCS, Cd 8 – 53). O índice de peróxido foi calculado pela equação 3, o qual foi expresso em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra.

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times N \times f \times 1000}{M_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

V_{branco} = volume em mL de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco

V_{amostra} = volume em mL de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra

M_{amostra} = Massa da amostra em gramas

f = fator da solução de tiosulfato de sódio

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

4.2.5 Determinação do ponto de fusão

Foi determinado utilizando o método de tubo capilar fechado (AOCS, Cc 3 – 25).

4.2.6 Determinação do índice de acidez

Pesou-se alíquotas entre 2-5 g de óleo em um erlenmeyer, adicionou-se entre 50 e 100 mL de álcool etílico 95% e 2 mL de fenolftaleína 1%. Titulou-se com hidróxido de sódio 0,1N até o aparecimento da cor rósea (AOCS, Ca 5a - 40). O índice de acidez foi calculado com base na equação 4, expresso em % de ácidos graxos livres.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V_{\text{amostra}} \times N \times f}{M_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

V_{amostra} = volume em mL de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

f = 28,2 (acidez em ácido oléico) e 20,0 (acidez em ácido láurico)

M_{amostra} = Massa da amostra em gramas

4.2.7 Determinação da cor

Foi determinada pelo método Lovibond (RYBN digital PFX 880L) em célula de 1 polegada (AOCS, método Cc 13e-92).

4.3 Perfil de Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos foi obtido por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos presentes nas amostras, segundo o método oficial Ce 1-62 da AOCS (AOCS, 2005). Os ésteres metílicos foram obtidos pela saponificação de 0,2-0,3 g da amostra, conforme a metodologia proposta por Hartman e Lago (1973).

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Varian GC (Varian Inc., USA), modelo CP3380, equipado com uma coluna capilar CP-Sil 88 (60 m x 0,25 mm) e um detector de ionização de chama, nas seguintes condições experimentais: injeção split, razão de 50:1; hélio como gás de arraste, vazão de 1,5 mL/min. O programa de temperatura utilizado foi inicialmente 3 minutos a 130 °C; aquecimento gradual a 220 °C por 9 minutos e 35 minutos a 220°C. A temperatura do injetor foi de 245°C e a temperatura do detector de 280°C.

A identificação dos picos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com de padrões conhecidos de ácidos graxos metilados (Sigma) analisados sob as mesmas condições experimentais das amostras e a quantificação foi feita por normalização interna.

4.4 Determinação simultânea de vitamina E e carotenos por HPLC

A determinação de vitamina E e carotenos nos óleos vegetais foi realizada no Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E) da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp (Universidade Estadual de Campinas).

4.4.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras foi realizada conforme preconizado pela AOCS (método Ce 8-89), que recomenda para amostras de óleos vegetais a diluição

direta na fase móvel, enquanto que para amostras de gorduras a extração por saponificação (AOCS, 2005).

A metodologia de extração das amostras de gorduras foi realizada conforme os protocolos descritos por Ye, Landen, Eitenmiller (2001) e Darnet et al. (2011) que envolveu uma etapa de saponificação e extração líquido-líquido (ANEXO C), conforme ilustrado na figura 9.

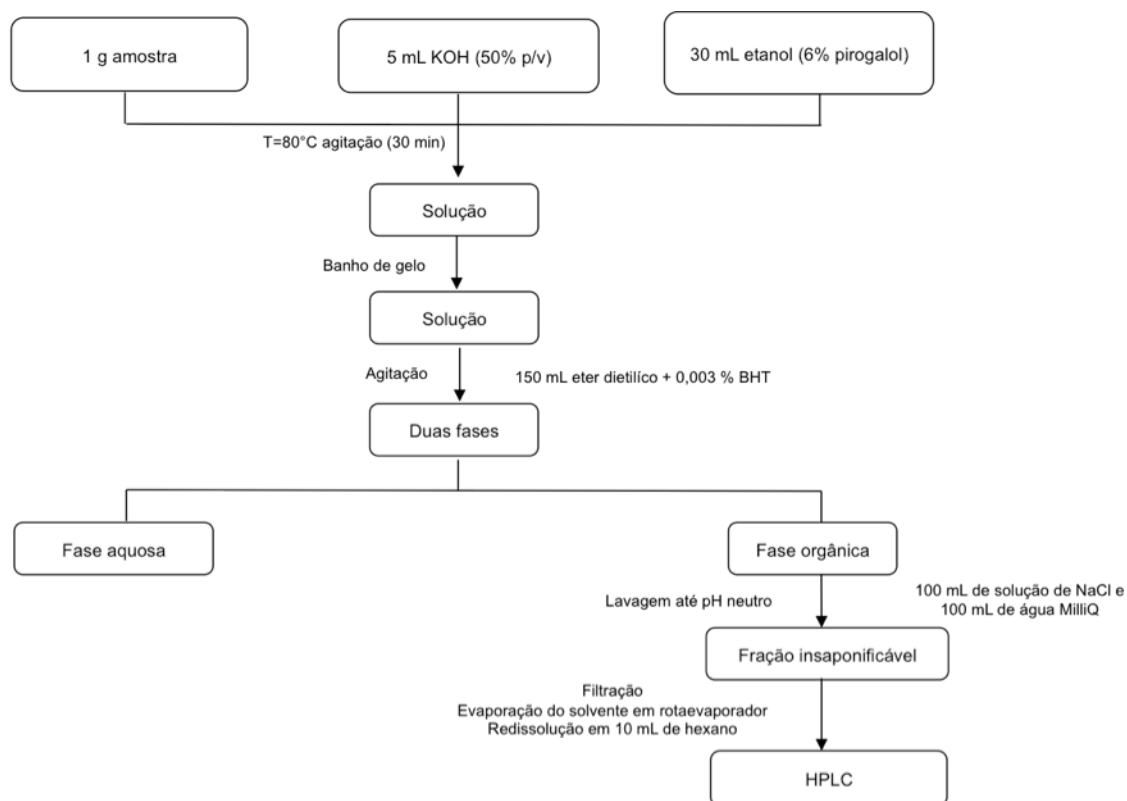


FIGURA 9. Etapas de preparação das amostras.

Para avaliar o rendimento de extração da vitamina E e β -caroteno, foram feitos testes recuperação dos padrões das vitaminas, utilizando o óleo de coco como material de referência, por simular uma matriz oleaginosa e apresentar baixas ou nenhuma quantidade das vitaminas analisadas.

4.4.2 Preparo dos padrões de carotenos e tocoferóis

As soluções iniciais dos padrões de α -, β -, γ -, δ -tocoferol (Calbiochem, USA, pureza >96%) e β -caroteno (Fluka, Germany, pureza >97%) foram preparadas em hexano (Tedia, pureza 95%) a uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e armazenadas

em frascos âmbar a -18°C . Para a padronização externa, diferentes concentrações dos padrões de tocoferóis e β -caroteno foram preparados a partir da solução inicial e injetados separadamente, em triplicata, na seguinte ordem crescente de concentração: 1 a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 0,4 a 50,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram determinados pela relação sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente (ANEXO D).

4.4.3 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em sistema HLPC (Shimadzu, Japan), composto de uma bomba quaternária (LC-20AT), injetor automático (SIL-20A), degaseificador (DGU-20A), forno (CTO-10AS), detector de fluorescência (RF-10AXL) e detector de arranjo de diodos (SPA-M20A). A separação dos compostos foi realizada em uma coluna CLC-SIL (Shimadzu, 250 x 4,6 mm e 5 μm de tamanho da partícula) de fase normal, nas seguintes condições experimentais: hexano e isopropanol (99,5:0,5 v/v) como fase móvel; vazão de 1 mL/min; temperatura da coluna de 20°C . As amostras foram diluídas em hexano e alíquotas de 10 μL foram injetadas.

4.5 Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e, para a comparação das médias, o teste de Tukey, realizados pelo programa estatístico SAS 9.2.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química dos óleos e gorduras de frutos Amazônicos

Na tabela 3, encontram-se os resultados referentes as propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras analisados neste estudo. Nos óleos de buriti e pracaxi, observam-se elevados índices de acidez e índices de peróxido adequados, visto que a RDC n°270 (BRASIL, 2005) recomenda que óleos vegetais prensados à frio e não refinados devem apresentar acidez e índice de peróxido de no máximo 4,0 mg KOH/g e 15 meq/kg, respectivamente (BRASIL, 2005b).

Vásquez-Ocmín et al. (2010) encontraram resultados de índice de peróxido de 12,46 meq/kg e índice de acidez de 3,54 mg KOH/g em óleo de buriti produzido na Região de Loreto, Peru. O resultado de índice de peróxido foi similar ao deste estudo, em contrapartida, um nível de acidez menor do que o encontrado neste estudo foi observado por esses autores.

Com relação as gorduras, a gordura de ucuúba apresentou maior índice de acidez do que a de muru-muru, em contrapartida, o índice de peróxido para a mesma foi menor comparado com a gordura de muru-muru. Menores índices de acidez (0,1 mg KOH/g) e peróxido (3,6 meq/kg) foram encontrados por Mambrim e Barrera-Arellano (1997) na gordura de muru-muru.

Os elevados índices de acidez e peróxidos indicam que essas amostras possivelmente sofreram alterações oxidativas e/ou enzimáticas, o que pode estar relacionado com fatores como a origem, grau de maturação, condições de armazenamento das sementes e principalmente, de extração do óleo (SHAHIDI, 2005).

Os parâmetros de índice de saponificação, índice de iodo, índice de refração e ponto de fusão estão relacionados principalmente com as características intrínsecas de cada óleo e gordura vegetal, como comprimento de cadeias e números de insaturações dos compostos carbônicos (O'KEEFE; PIKE, 2010).

Observa-se que os óleos de buriti e pracaxi apresentaram elevados índices de iodo e refração comparados às gorduras, indicando que os mesmos apresentam altos níveis de insaturação. Ao contrário, os pontos fusão foram menores para os óleos comparados as gorduras, indicando um alto grau de saturação das gorduras.

O índice de saponificação encontrado neste estudo variou amplamente de 170,75 a 258, 241 mg KOH/g. O óleo de buriti está dentro da faixa de 180 a 199 mg KOH/g que é estabelecido para o óleo de arroz (*Oryza sativa*), o óleo de pracaxi encontra-se dentro da faixa de 168 a 181 mg KOH/g do óleo de canola (*Brassica napus*), a gordura muru-muru encontra-se dentro da faixa de 248 a 265 mg KOH/g do óleo de coco (*Cocos nucifera*) e a gordura de ucuúba encontra-se próximo da faixa de 240 a 250 mg KOH/g do óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare*) (CODEX ALIMENTARIUS, 2009; WHITE, 2008).

Os resultados de índice de saponificação, índice de iodo, índice de refração e ponto de fusão estão de acordo com os relatados na literatura por Mambrim e Barrera-Arellano (1997) para a manteiga de muru-muru e por Vásquez-Ocmín et al. (2010) para o óleo de buriti, com exceção do ponto de fusão (10°C) deste último que foi menor do que o observado nesse estudo.

TABELA 3. Características físico-químicas de gorduras vegetais amazônicas.

Análises*	Óleos e gorduras				
	<i>Muru-muru</i>	<i>Ucuúba</i>	<i>Buriti</i>	<i>Pracaxi</i>	
Ácidos graxos livres**	5,098 ^a ± 0,006	32,340 ^b ± 0,139	5,757 ^c ± 0,122	5,439 ^d ± 0,004	
Índice de peróxidos (meq kg ⁻¹)	22,853 ^a ± 0,919	0,328 ^b ± 0,049	12,049 ^c ± 0,104	8,230 ^d ± 0,190	
Índice de refração (°C)	1,457 ^a ± 0,004	1,461 ^a ± 0,006 ^d	1,468 ^a ± 0	1,469 ^a ± 0	
Índice de iodo (gI ₂ 100g ⁻¹)	11,153 ^a ± 0,448	18,410 ^b ± 0,912	77,404 ^c ± 0,837	66,832 ^d ± 1,235	
Índice de saponificação (mg KOH g ⁻¹)	258,241 ^a ± 48,295	219,978 ^b ± 3,370	185,68 ^c ± 3,04 ^c	170,75 ^d ± 4,04	
Ponto de fusão (°C)	31,667 ^a ± 0,153	39,300 ^b ± 1,212	25,1 ^c ± 0,07	18,5 ^d ± 0,64	
Cor	Vermelho	10,4	nd	40,0	9,9
	Amarelo	70,0	nd	63,0	72,2
	Azul	0	nd	0,0	2,2

Nota: ^{a,b,c,d} Letras minúsculas iguais na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

*Valores obtidos da média dos resultados das análises feitas em triplicata ± desvio padrão;

** As amostras de ucuúba, buriti e pracaxi foram expressos em % ácido oléico e a amostra de muru-muru em % ácido láurico.

nd: não detectado.

5.2 Perfil de ácidos graxos

Na Tabela 4, encontram-se os resultados da composição de ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras analisados neste estudo. Os óleos de buriti e pracaxi apresentam altos níveis de insaturações, conforme observado anteriormente pelo índice de iodo, sendo os ácidos graxos monoinsaturados predominantes.

TABELA 4. Perfil de Ácidos Graxos de gorduras vegetais amazônicas.

<i>Ácidos graxos (%)</i>		<i>Óleos e gorduras</i>			
		<i>Muru-muru</i>	<i>Ucuíba</i>	<i>Buriti</i>	<i>Pracaxi</i>
Ácido caprílico	C 8:0	1,41	0,09	nd	nd
Ácido cáprico	C 10:0	1,43	0,50	nd	nd
Ácido láurico	C 12:0	49,60	15,29	0,02	0,14
Ácido tridecanóico	C13:0	0,08	0,11	nd	nd
Ácido mirístico	C 14:0	28,25	77,48	0,12	0,10
Ácido pentadecanóico	C15:0	nd*	0,41	0,04	0
Ácido palmítico	C 16:0	6,53	4,45	17,59	2,37
Ácido palmitoleico	C16:1	nd	0,19	0,26	nd
Ácido heptadecanóico	C17:0	nd	nd	0,08	nd
Ácido esteárico	C 18:0	2,57	0,90	1,47	4,65
Ácido oléico	C 18:1	6,85	0,06	78,55	72,16
Ácido linoléico	C 18:2	3,14	0,50	1,13	18,84
Ácido α - linolênico	C 18:3	0,12	nd	0,09	1,52
Ácido araquídico	C 20:0	1,19	nd	0,66	0,22
Ácido palmitoléico	C 22:0	0,026	nd	nd	nd
Ácidos graxos saturados		89,90	99,25	19,98	7,47
Ácidos graxos monoinsaturados		6,85	0,25	78,81	72,16
Ácidos graxos poliinsaturados		3,25	0,50	1,22	20,36

NOTA: * nd: não detectado

O ácido oléico foi o ácido graxo majoritário em ambos os óleos analisados, seguido do ácido palmítico no óleo de buriti e ácido linoléico no óleo de pracaxi. Este perfil de ácidos graxos encontrado nos óleos de buriti e pracaxi é

semelhante ao encontrado nos óleos de arroz e canola (WHITE, 2008).

Resultados similares do conteúdo de ácido oléico em óleo de buriti tem sido relatados por França et al. (1999) com 79%; Vásquez-Ocmín et al. (2010) com 72% e Rodrigues et al. (2010) com 76%.

O conteúdo de ácido oléico detectado nos óleos de buriti e pracaxi são similares ao encontrado no óleo de oliva. Este óleo tem sido considerado benéfico à saúde, tendo em vista a predominância de ácido oléico, o qual tem demonstrado efeitos cardioprotetores (DUBOIS et al., 2007). Baseado nisso, Rodrigues et al. (2010) sugerem que óleos de frutos amazônicos apresentam um excelente valor nutricional, além de que podem ser considerados como um alimento nutracêutico.

As gorduras de muru-muru e ucuúba são constituídas, principalmente, por ácidos graxos saturados, tendo como ácidos graxos majoritários, os ácidos láurico e mirístico, respectivamente.

O percentual de ácido láurico encontrado na gordura de muru-muru é similar ao encontrado nos óleos de babaçu, coco e palmiste, conhecidos pelo elevado conteúdo de ácido láurico (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Segundo Pesce (2009), a aplicação da gordura de muru-muru em produtos alimentícios apresenta vantagens sobre os demais óleos láuricos, por possuir maior consistência, devido ao seu ponto de fusão (32°C) ser superior ao do óleo de palmiste (25°C) e do coco (22,7°C). Tal característica permite que essa gordura seja misturada a outras gorduras vegetais que apresentam ponto de fusão mais baixo.

A gordura de ucuúba apresentou um alto percentual de ácido mirístico, seguido do ácido láurico. Existem poucas fontes de oleaginosas ricas em ácido mirístico, sendo as espécies pertencentes ao gênero *Myristica*, popularmente conhecidas como noz-moscada as principais fontes desse ácido. O conteúdo de ácido mirístico nessas espécies pode variar de 55 a 78%, percentual similar ao encontrado na gordura de ucuúba, assim, essa gordura pode ser considerada outra fonte de ácido mirístico (MAYA et al., 2006).

Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura (PESCE, 1985; MAMBRIM; BARRERA-ARELLANO, 1997; SARAIVA, 2008), que descreve que o ácido láurico (43-51%) é mais abundante na gordura de muru-muru, seguido do ácido mirístico (26-37%). Diferentemente da gordura de ucuúba que apresentou um alto percentual de ácido mirístico (64-73%), seguido do ácido láurico (13-15%).

Óleos e gorduras ricos em ácido láurico e mirístico possuem um grande

interesse comercial. De acordo com a FAO (1994), essas matérias primas produzem as melhores moléculas com propriedades surfactantes, devido apresentarem um comprimento de cadeia carbônica intermediário que fornecem melhor desempenho emulsificante, sendo utilizados na produção de sabão, detergente e na indústria oleoquímica. Adicionalmente, o ácido mirístico e seus derivados são bastante empregados na indústria de cosméticos, devido ao seu efeito emoliente na pele.

5.3 Determinação analítica de vitamina E e carotenos em óleos e gorduras de frutos Amazônicos por HPLC

5.3.1 Parâmetros analíticos do método de determinação de vitamina E e carotenos

A identificação dos tocoferóis e carotenos foi determinada com base nos tempos de retenção dos padrões comerciais dessas vitaminas. A figura 10 apresenta um cromatograma típico dos padrões utilizados. A ordem de eluição dos tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em sistema de fase normal já é bem elucidada na literatura, a qual segue a seguinte ordem: α -T \rightarrow α -T3 \rightarrow β -T \rightarrow γ -T \rightarrow β -T3 \rightarrow γ -T3 \rightarrow δ T \rightarrow δ -T3 (KAMAL-ELDIN et al., 2000). Baseados nisso, os tocotrienóis foram identificados com base no tempo de retenção dos isômeros homólogos.

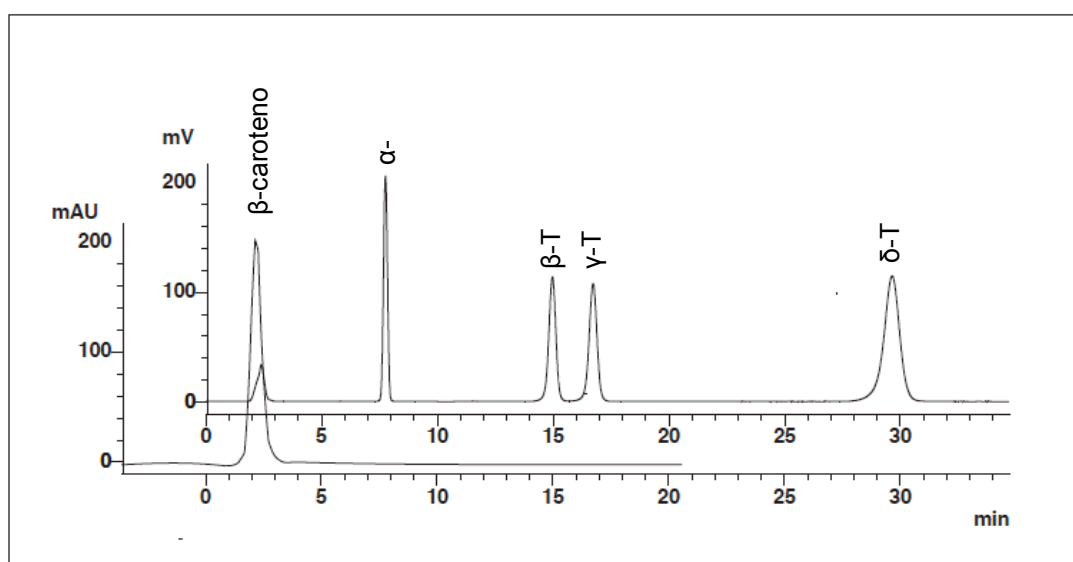


FIGURA 10. Cromatogramas dos padrões de β -caroteno, α -tocoferol (α -T), β -tocoferol (β -T), γ -tocoferol (γ -T) e δ -tocoferol (δ -T) por HPLC. Condições cromatográficas: coluna CLC-SIL com sistema de eluição isocrático, fase móvel hexano: isopropanol (99,5:0,5 v/v); vazão: 1mL/min.

A quantificação das vitaminas foi realizada através do método de padronização externa. As curvas de calibração, bem como as equações de regressão linear, foram obtidas a partir da correlação entre a concentração dos padrões ($\mu\text{g/mL}$) e a área dos picos correspondentes, as quais apresentaram uma boa linearidade.

Isso pode ser verificado pelos valores dos coeficientes de correlação (R^2), que foram próximos do valor 1 (Tabela 5), estando de acordo com os valores estabelecidos pelas normas vigentes. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Nessa mesma tabela, encontram-se os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das vitaminas analisadas pelo método proposto.

TABELA 5. Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) das vitaminas analisadas pelo método aplicado.

Composto	Faixa linear	Equação	R^2	LD $\mu\text{g/mL}$	LQ $\mu\text{g/mL}$
α -tocoferol	50 - 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 272701x - 2433,9$	0,993	0,4206	0,1262
	7,5 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 8528,9x - 3,891$	0,973		
β -tocoferol	50 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 186123x - 1707$	0,987	0,0125	0,0417
	7,5 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 44997x - 26,287$	0,991		
γ -tocoferol	50 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 209427x - 1876,7$	0,988	0,0098	0,0328
	7,5 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 53914x - 31,176$	0,993		
δ -tocoferol	50 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 481039x - 2410,4$	0,994	0,0013	0,0043
	7,5 - 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 274330x - 41,435$	0,999		
β -caroteno	50,8 - 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$y = 72093x - 19,019$	0,999	0,0166	0,0553

5.3.2 Recuperação dos padrões de tocoferóis e β -caroteno

Os níveis de recuperação dos padrões adicionados ao óleo de coco variam de 83 a 100%, com baixo desvio-padrão ($\leq 5\%$) (Tabela 6). Em determinações analíticas de traços ou impurezas, são aceitos desvio padrão relativo de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBALDI et al., 2004).

TABELA 6. Recuperação dos padrões de tocoferóis em amostra óleo de coco.

Composto	Recuperação (%)
α -tocoferol	100,39 \pm 0,43
β -tocoferol	100,52 \pm 0,25
γ -tocoferol	100,18 \pm 0,11
δ -tocoferol	98,62 \pm 0,34
β -caroteno	83,17 \pm 5,00

NOTA: * Médias das análises realizadas em quadruplicatas \pm desvio-padrão.

O menor nível de recuperação foi observado para o β -caroteno, devido a sua sensibilidade a temperaturas acima de 40°C e condições alcalinas, que podem provocar a isomerização e degradação desse composto (KHACHIK, 2009). No entanto, esse nível de recuperação é aceitável para determinações analíticas que apresentam várias etapas. Segundo Ribaldi et al. (2004), os intervalos aceitáveis de recuperação na análise de resíduos, geralmente estão entre 70 e 120%.

5.3.3 Análise quantitativa de vitamina E e carotenos em óleos e gorduras de frutos Amazônicos

Os teores de vitamina E e carotenos encontrados nos óleos e gorduras de frutos Amazônicos analisados estão apresentados na tabela 7. Observa-se que os níveis de vitamina E variaram amplamente entre as amostras, de 197 a 1511 ppm. A atividade de vitamina E também foi calculada conforme recomendação do INSTITUTE OF MEDICINE (2003) e foi expresso em termos de α -tocoferol equivalentes (α -TE), o qual seguiu a ordem decrescente: buriti > muru-muru > pracaxi.

TABELA 7. Conteúdo de vitamina E em óleos e gorduras vegetais de frutos amazônicos

Concentração em ppm* (mg/kg)	Óleos e gorduras vegetais		
	Muru-muru	Buriti	Pracaxi
α -tocoferol	89,94 \pm 1,98	451,51 \pm 9,35	ND
β -tocoferol	91,52 \pm 0,26	761,87 \pm 12,17	ND
γ -tocoferol	10,09 \pm 1,37	56,71 \pm 0,68	416,13 \pm 2,69
δ -tocoferol	5,65 \pm 1,32	139,52 \pm 6,94	7,78 \pm 0,25
α -tocotrienol	ND	90,80 \pm 1,21	93,53 \pm 7,75
β -tocotrienol	ND	ND	79,92 \pm 1,38
γ -tocotrienol	ND	ND	ND
δ -tocotrienol	ND	10,60 \pm 0,57	ND
TOTAL	197,20	1511,00	597,36
α -TE**	136,89	869,54	73,90
β -caroteno	ND	1722,87 \pm 15,49	8,84 \pm 0,05

NOTA: * Médias das análises realizadas em triplicatas \pm desvio-padrão.

** α -TE (α -tocoferol equivalentes) foi obtido pela soma das concentrações dos isômeros de tococromanóis, com os seguintes fatores de correção: α -tocopherol, mg \times 1.0; β -tocopherol, mg \times 0.5; γ -tocopherol, mg \times 0.1; δ -tocopherol, mg \times 0.03; α -tocotrienol, mg \times 0.3; and β -tocotrienol, mg \times 0.05 (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000);

ND: não detectado; NQ: não quantificado.

O óleo de buriti apresentou todas as isoformas dos tocoferóis (Figura 11), sendo o β -tocoferol o isômero predominante (762 ppm), seguido do α -, δ - e γ -tocoferol. Quanto aos tocotrienóis, às únicas isoformas detectadas foram α - e δ -tocotrienol, sendo a maior concentração encontrada para o primeiro.

Resultados similares foram observados por Silva et al. (2009) em óleo de buriti produzido na Região de Araguaia-TO, o qual apresentou um conteúdo total de tococromanóis de 1517 ppm e o β -tocoferol foi predominante. Entretanto, dos tocotrienóis eles identificaram γ -tocotrienol e δ -tocotrienol.

Este óleo também apresentou um elevado conteúdo de carotenos (1723 ppm). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Albuquerque et al. (2005) no óleo de buriti produzido na Região Amazônica (1707 ppm), os quais observaram que em torno de 73% dos carotenos totais presentes nesse óleo

corresponde a β -caroteno. Por outro lado, Silva et al. (2009) encontraram 1003 ppm em óleo de buriti da Região de Araguaia-TO.

Essas diferenças em óleos vegetais podem estar relacionadas a vários fatores, tais como condições climáticas, estado de maturação do fruto e condições de processamento (SAMPAIO et al., 2010). De fato, diferentes resultados de tocoferóis também têm sido relatados na literatura no fruto de buriti. Costa et al. (2010) encontraram em torno de $1355 \mu\text{g g}^{-1}$ de tocoferóis totais nesse fruto, enquanto que Rodrigues et al. (2010) quantificaram $717 \mu\text{g g}^{-1}$.

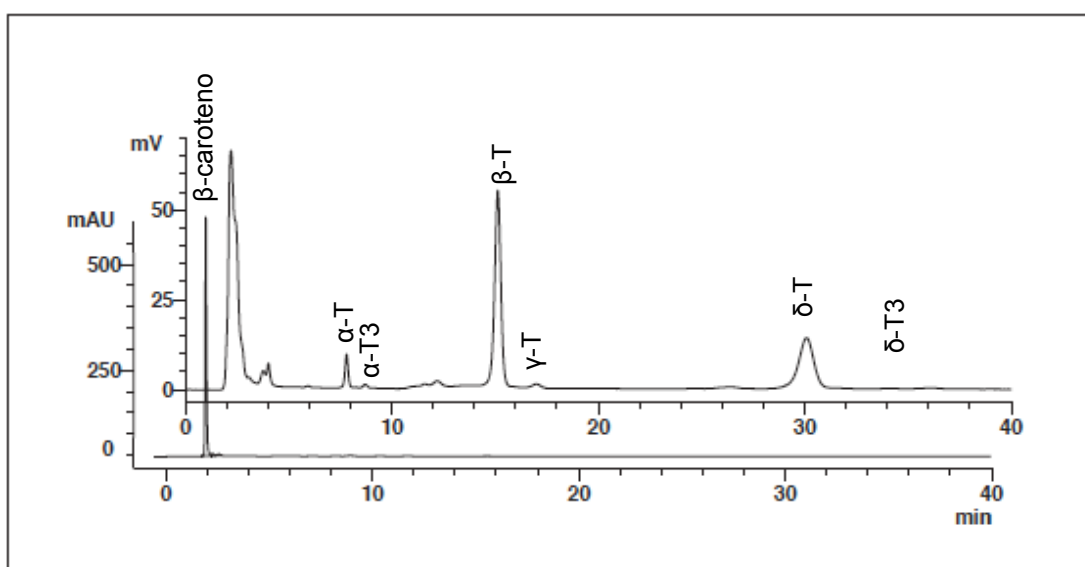


FIGURA 11. Cromatogramas das análises de vitamina E e carotenóides no óleo de buriti. Condições cromatográficas: coluna CLC-SIL com sistema de eluição isocrático, fase móvel hexano: isopropanol (99,5:0,5 v/v); vazão: 1mL/min.

O óleo de pracaxi apresentou apenas quatro isoformas dos tocóis (Figura 12), γ -, δ -tocoferol e α -, β -tocotrienol. γ -Tocoferol (416 ppm) foi o isômero predominante, apresentando valores similares aos encontrados no óleo de soja e milho, os quais são conhecidos entre os óleos vegetais por conterem maiores quantidades deste composto (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Foram quantificados baixos níveis de carotenos no óleo de pracaxi (9 ppm) comparado ao óleo de buriti.

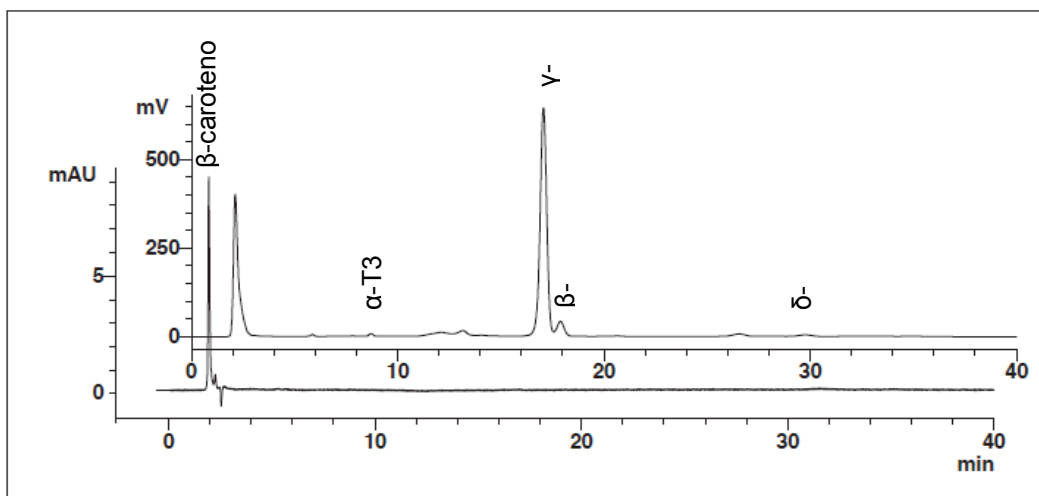


FIGURA 12. Cromatogramas das análises de vitamina E e carotenóides no óleo de pracaxi. Condições cromatográficas: coluna CLC-SIL com sistema de eluição isocrático, fase móvel hexano: isopropanol (99,5:0,5 v/v); vazão: 1mL/min.

A gordura de muru-muru apresentou todas as isoformas dos tocoferóis (Figura 13), sendo o β - (91 ppm) e α -tocoferol (90 ppm) as formas predominantes. Entretanto, não foi detectado nenhum tocotrienol. A ocorrência apenas de tocoferóis também tem sido observado na literatura para o *Astrocaryum vulgare*, espécie pertencente ao mesmo gênero do muru-muru (LUBRANO et al., 1994; RODRIGUES et al., 2010). Contudo, é importante ressaltar que em outras espécies pertencentes ao gênero *Astrocaryum* (*Astrocaryum chambira* e *Astrocaryum urostrachys*) tem sido relatada apenas a ocorrência dos tocotrienóis (SHUKLA, JENSEN, 1996).

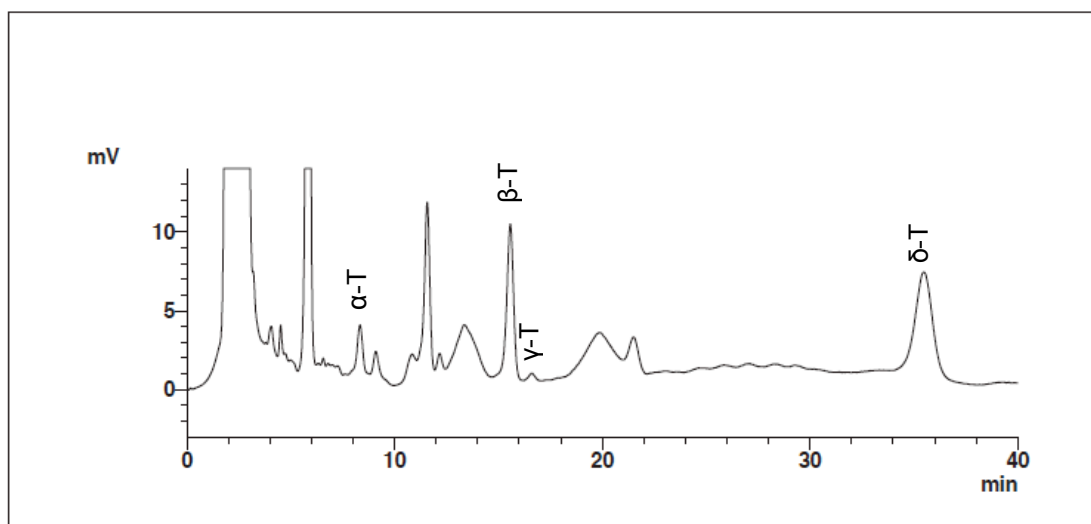


FIGURA 13. Cromatograma da análise de vitamina E na gordura de muru-muru. Condições cromatográficas: coluna CLC-SIL com sistema de eluição isocrático, fase móvel hexano: isopropanol (99,5:0,5 v/v); vazão: 1mL/min.

Na gordura de ucuúba não foi possível identificar e quantificar os tococromanóis, devido à presença de vários picos interferentes que co-eluíram no mesmo tempo de retenção desses compostos. Tendo em vista que os tococromanóis absorvem luz a 292 nm foi verificado a incidência desses compostos nesse comprimento de onda no detector de arranjo de diodos, no entanto não foi detectado a sua presença, comprovando que as amostras de gordura ucuúba analisadas não continham nenhuma isoforma da vitamina E (ANEXO E).

Os dados obtidos neste estudo mostram que o óleo de buriti, óleo de pracaxi, manteiga de muru-muru e manteiga de ucuúba são produtos potencialmente aplicáveis em diversos setores industriais, tais como, indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticos, oleoquímica e biocombustíveis. Entretanto, ainda são necessários estudos sobre a viabilidade de implantação dessas oleaginosas em produtos comerciais. A aplicação dessas oleaginosas no setor industrial aumentaria consideravelmente a sua produção, favorecendo o desenvolvimento sócio-econômico dessa região.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e considerando-se as condições experimentais, concluiu-se que:

- ✚ Os parâmetros físico-químicos avaliados mostraram a ocorrência de elevados índices de acidez nos óleos e gorduras analisados, bem como, elevados índices de peróxidos observados apenas nas gorduras, indicando possivelmente uma degradação parcial dessas amostras;
- ✚ O perfil de ácidos graxos mostrou que os óleos de buriti e pracaxi são fontes potenciais de ácido oléico (>70%), enquanto que a gordura de muru-muru apresentou um alto percentual de ácido láurico e a gordura de ucuúba em ácido mirístico;
- ✚ A composição de tocoferóis e tocotrienóis nos óleos e gorduras analisados variou amplamente, de 197 a 1511 ppm e a atividade de vitamina E (α -TE) nessas amostras seguiu a ordem decrescente: Buriti > muru-muru > pracaxi. Na gordura de ucuúba não foi detectado nenhum tococromanol;
- ✚ Os carotenos foram detectados apenas no buriti e pracaxi, sendo o maior conteúdo desse composto encontrado no buriti (>1700 ppm);
- ✚ Os óleos e gorduras de frutos amazônicos analisados nesse estudo podem ser utilizados como fontes de baixo custo de antioxidantes naturais (vitamina E e carotenos), ácidos graxos saturados (ácido láurico e mirístico) e insaturados (ácido oléico), tendo em vista que atualmente esses compostos possuem grande interesse comercial e apresentam uma ampla aplicabilidade em indústrias alimentícias, oleoquímicas, farmacêuticas e cosméticos.

7. REFERÊNCIAS

- AHERNE, S. A.; DALY, T.; JIWAN, M. A.; O'SULLIVAN, L.; O'BRIEN, N. M. Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. **Food Research International**, v. 43, p. 1449–1454, 2010.
- ALBUQUERQUE, M. L. S., GUEDES, I., JR, P. A., MOREIRA, S. G. C., NETO, N. M. B., CORREA, D. S. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) Oil by Absorption and Emission Spectroscopies. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1113-1117, 2005.
- ALMEIDA, S. S.; ROCHA FILHO, G. N.; ZOGHBIM, M. G. B. **O potencial da flora oleífera na Amazônia**. In: PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia (revista da veterinária). Belém, Pará, 2. ed., 2009.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, mar./abr., 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p.145-54, 2004.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003**, 2003.
- AOAC. **International, Official Methods of Analysis**, 18th ed., AOAC International, Arlington, VA, 2005.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, 5º ed. Champaign, 2005.
- AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 3, p. 231-55, 2000.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; ALENCAR, A. A.; NUNES, X. P.; TOMAZ, A. C. A.; SENA-FILHO, J. G. P.; ATHAYDE-FILHO, F.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 135-154, jan./mar., 2008.
- BERACA. Óleos e Manteigas vegetais. Disponível em: < www.beraca.com >. Acesso em: 30/05/2011.
- BEREAU, D.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; BANOUB, J.; BRAVO, R. FA and unsaponifiable composition of five Amazonian palm kernel oils. **Journal of the**

American Oil Chemists Society, v. 80, n. 1, p. 49-53, 2003.

BERNSTEIN, P. S.; KHACHIK, F.; CARVALHO, L. S.; MUIR, J.; ZHAO, D.; KATZ, N. B. Identification and Quantification of Carotenoids and their Metabolites the Tissues of the Human Eye. **Experimental Eye Research**, v. 72, p. 215-223, 2001.

BESTER, D.; ESTERHUYSE, A. J.; TRUTER, E. J.; ROOYEN, J. V. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. **Nutrition Research Reviews**, p. 1-15, 2010.

BOHM, F.; EDGE, R.; LAND, E. J.; MCGARVEY, J.; TRUSCOTT, T. G. Carotenoids Enhance Vitamin E Antioxidant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 621-622, 1997.

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 of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 80, n. 7, p. 913-938, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de setembro de 2005, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de setembro de 2005, 2005b.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB J.**, v.13, p.1145-1155, 1999.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Faseb Journal**, v. 9, p. 1552-1558, dec., 1995.

BRITTON, G.; KHACHIK, F. **Carotenoids in Food**. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids: Nutrition and Health. v. 5. Birkhäuser Verlag: Switzerland. 2009. 464p.

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.

BURRI, B. J.; CHANG, J. S. T.; NEIDLINGER, T. R. β -Cryptoxanthin and α -carotene rich foods have greater apparent bioavailability than b-carotene-rich foods in Western diets. **British Journal of Nutrition**, v. 1, p. 1-8, set., 2010.

- CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenóides pro-vitamínicos A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 571-578, jul./set., 2005.
- CAMPOS, F. M.; SANTANA, 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.
- CHING, L. S.; MOHAMED, S. Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3101-3105, jun., 2001.
- CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p.1374-1380, 2008.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – FAO/WHO. **Codex Standard for named vegetable oils**, Codex Stan 210-1999, 2009.
- COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, 2010. *In press*.
- COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CUVELIER, C.; DOTREPPE, O.; ISTASSE, L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 147, p. 315-324, 2003.
- DARNET, S.; SERRA, J. L.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. A High-Performance Liquid Chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, v. 44, p. 2107-2111, 2011.
- DELLAPENNA, D.; POGSON, B. J. Vitamin Synthesis in Plants : Tocopherols and Carotenoids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 711–38, 2006.
- DUBOIS, V.; BRETON, S.; FANNI, M. L. J.; PARMENTIER, M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **European Food Research and Technology**, v. 109, p. 710–732, 2007.
- EITENMILLER, R. R.; YE, L.; LANDEN, W. O. **Vitamin analysis: For the health and food science**. 2. Ed. CRC press. 2008. 662p.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Market analysis for trimyristin and myristic acid**. Rome, September, 1994. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: <07/07/2011>.
- FONTANA, J. D. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 1, p. 48-54, 2000.

FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 247–256, 1999.

FRANK, J. **Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability Model studies in rats and humans**. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, 2004. 57p.

FRANKE, S.; FROHLICH, K.; WERNER, S.; BOHM, V.; SCHONE, F. Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1122–1129, 2010.

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

GALLI, F.; STABILE, A.M.; BETTI, M.; CONTE, C.; PISTILLI, A.; RENDE, M.; FLORIDI, A.; AZZI, A. The effects of alpha- and gamma-tocopherol and their carboxyethyl hydroxychroman metabolites on prostate cancer cell proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 97–102, 2004.

GIANELLO, R., LIBINAKI, R., AZZI, A., GAVIN, P.D., NEGIS, Y., ZINGG, J.-M., HOLT, P., KEAH, H.-H., GRIFFEY, A., SMALLRIDGE, A., WEST, S., OGRU, E. α -Tocopheryl phosphate: a novel, natural form of vitamin E. *Free Radical Biol. Med.* v. 39, p. 970–976, 2005.

GIMENO, E.; CALERO, E.; CASTELLOTE, A. I.; LAMUELA-RAVENTO, R. M.; TORRE, M. C.; LOPEZ-SABATER, M. C. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 255–259, 2000.

GIOIELLI, L. A. **Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia**. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.

GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. **Journal of Chromatography A**, n.1048, p. 195–198, 2004.

GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 537-548, set./out., 2007.

GUNSTONE, F. D. **Vegetable oil in Food Technology: Composition, properties and uses**. 2. ed. Wiley Blackwell, 2011.

GUNSTONE, F. D.; NORRIS, F. A. **Fatty acids and lipid chemistry**. Londres, Blackie Acad., 1996, 86p.

HARTMAN, L., LAGO, R. C. A. **A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. *Lab. Pract.*, London, v.22, p.475-476, 1973.

HEINONEN, M.; PIIRONEN, V. The tocotrienol, and vitamin E content of the average Finnish diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**,

v. 61, p. 27–32, 1991.

HOAGLAND, R.; SNIDER, G. G. Digestibility of some animal and vegetable fats. **The Journal of Nutrition**, p. 295-302, 1943.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 407–412, 2007.

HUNTER, S. C.; CAHOON, A. E. B. Enhancing Vitamin E in Oilseeds : Unraveling Tocopherol and Tocotrienol Biosynthesis. **Lipids**, p. 97-108, 2007.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary intake for vitamin C, vitamin E, selenium e carotenoids**. Washington, D. C. National Academic Press, 2000.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The Encyclopedia of fruit and nut**. Cambridge University Press, 2006.

KAMAL-ELDIN, A.; GORGEN, S.; PETTERSSON, J.; LAMPI, A. 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.

KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. A Multivariate Study of the Correlation Between Tocopherol Content and Fatty Acid Composition in Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 74, no. 4 (1997).

KHACHIK, F.; GOLI, M. B.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W. R.; TENORIO, M. D.; BARRERA, M. R. Effect of Food Preparation on Qualitative and Quantitative Distribution of Major Carotenoid Constituents of Tomatoes and Several Green Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 390-398, 1992.

KHACHIK, F. **Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies**. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids: Nutrition and Health. v. 5. Birkhäuser Verlag: Switzerland. 2009. 464p.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; GOLI, M. B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 71-80, 1991.

LAMPI, A. M., KAMAL-ELDIN, A.; PIIRONEN, V. **Tocopherols and Tocotrienols from Oil and Cereal Grains**. In: SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, L. M. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. CRC Press. v. 2, 2002. 432p.

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.

LUBRANO, C., ROBIN, J. R., KHAIAT, A. Fatty-acid, sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of 6 palm species in french-guiana. **Oléagineux**, v. 49, n. 2, p. 59-65, 1994.

MAIANI, G.; CASTN, M. J. P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODN, I.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 194-218, 2009.

MAMBRIM, M. C. T.; BARRERA-ARELLANO, D. Caracterización de aceites de frutos de palmeras de la región amazónica del Brasil. **Grasas y Aceites**. v. 48., p. 154-158, 1997.

MAYA, K. M.; ZACHARIAH, J.; KRISHNAMURTHY, K. S.; REMA, J.; KRISHNAMOORTHY, B. Fatty acids and leaf amino acids in *Myristica fragans* Houtt. and related taxa. **Indian Journal Horticulture**, v. 63, n. 3, p. 316-318, 2006.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. **Archivos Latino Americanos de Nutricion**. v. 57, n. 2, 2007.

MENE-SAFFRANÉ, L.; DELLAPENNA, D. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 301-309, 2010.

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.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2003.

MIYAZAWA, T.; SHIBATA, A.; SOOKWONG, P.; KAWAKAMI, Y.; EITSUKA, T.; ASAI, A.; OIKAWA, S.; NAKAGAWA, K. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 20, n. 2, p. 79-86, feb., 2009.

MONDE, A. A.; MICHEL, F.; CARBONNEAU, M. A.; TIAHOU, G.; VERNET, M.; EYMARD-DUVERNAY, S.; BADIOU, S.; ADON, B.; KONAN, E.; SESSA, D.; CRISTOL, J. P. Comparative study of fatty acid composition, vitamin E and carotenoid contents of palm oils from four varieties of oil palm from Cote d'Ivoire. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2535–2540, 2009.

MOURÃO, D. M. N. S. S.; COELHO, S. B.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 529-539, jul./ago., 2005.

NAKAGAWA, K.; KIKO, T.; HATADE, K.; ASAI, A.; KIMURA, F.; Tsuduki, T.; ARAI, H.; MIYAZAWA, T. Development of a high-performance liquid

chromatography-based assay for carotenoids in human red blood cells: Application to clinical studies. **Analytical Biochemistry**, v. 381, p. 129–134, 2008.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 498-502, Junho 2008.

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

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, p. 165–168, 2009.

O'BRIEN, R.D. **Fats and oils: formulating and processing for applications**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2003, 592p.

O'KEEFE, S. F.; PIKE, O. A. **Fat Characterization**. In: NIELSEN, S. S.(ed) Food Analysis. 4. ed. Springer. 2010.

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.

OTHMAN, N.; MANAN, Z. A.; ALWIN, S. R. W.; SARMIDI, M. R. A review of technology for carotenoids and vitamin E recovery from palm oil. **Journal Applied Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1187-1192, 2010.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. (Eds.). **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington: The National Academic Press, 2006, 560 p.

PACKER, L.; WEBER, S.U.; RIMBACH, G. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 369–373, 2001.

PAIVA, S. A. R.; RUSSELL, R. M. β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 426–433 1999.

PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – Uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.

PESCE, C. **Oil palms and other oilseeds of the Amazon**. Michigan: Reference Publications, 1985.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia (revista da veterinária)**. Belém, Pará, 2. ed., 2009.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 1, p. 141-164, 2000.

- PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 5132–5138, 1998.
- PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Simultaneous Detection of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls in Vegetable Oils by Direct Injection C₃₀ RP-HPLC with Coulometric Electrochemical Array Detection. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 7, p. 633-640, 2002.
- RAMADAN, M. F.; MÖRSEL, J. T. Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 521–527, 2002.
- REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. **Óleos e gorduras: aplicações e implicações**. **Revista Analytica**, n. 27, fev./mar. 2007.
- RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R. A.; SUH, M.; MOHAMMED, R. D.; MOGHADASIAN, H. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 109, p. 668-679, 2009.
- RODRIGUES, A. M. C.; DARNET, S.; SILVA, L. H. M. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 2000-2004, 2010.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: OMNI Research, 2001. 64 p.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H. T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 445– 463, 2008.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de carotenóides: Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos**. Brasília, 2008. 111p.
- ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.
- RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A**, v.935, p.45–69, 2001.
- RYYNÄNEN, M.; LAMPI, A.M.; SALO-VÄÄNÄNEN, P.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEN, V. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **Journal of Food**

Composition and Analysis, v. 17, n. 6, p. 749-765, 2004.

SALDEEN, K.; SALDEEN, T. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. **Nutrition Research**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 877-899, oct., 2005.

SAMPAIO, K. A.; CERIANI, R.; SILVA, S. M.; TAHAM, T.; MEIRELLES, A. J. A. Steam Deacidification of Palm Oil. **Food and Bioproducts Process**, 2010. In press.

SARAIVA, S. A. **Caracterização de Matérias-Primas e Produtos Derivados de Origem Graxa por Espectrometria de Massas**. Unicamp. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2004.

SCHERF, H.; MACHLIN, L. J.; FRYE, T. M.; KRAUTMAN, B. A.; WILLIAMS, S. N. Vitamin E biopotency: Comparison of food-various 'natural-derived' and chemically synthesized α -tocopherols. **Animal Feed Science Technology**, v. 59, p. 115-126, 1996.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 7-30, 2005.

SEMBA, R. D.; PEE, S.; SUN, K.; CAMPBELL, A. A.; BLOEM, M. W.; RAJU, V. K. Low intake of vitamin A-rich foods among children, aged 12–35 months, in India: association with malnutrition, anemia, and missed child survival interventions. **Nutrition**, v. 26, p. 958–962, 2010.

SEPPANEN, C. M.; RAHMANI, M.; CSALLANY, A. S. Simultaneous determination of chlorophylls, pheophytins, β -carotene, tocopherols and tocotrienols in olive and soybean oils by high-performance liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1644-1647, 2003.

SEPPANEN, C. M.; SONG, Q.; CSALLANY, A. S. The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 5, p. 469-481, fev., 2010.

SHAHIDI, F. **Quality Assurance of Fats and Oils**. In: Shahidi, F.(ed). *Bailey's industrial oil & fats products*. 6. ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. **Extraction and Analysis of Lipids**. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B (eds). *Food lipids : chemistry, nutrition, and biotechnology*. CRC Press, 3. ed., 2008.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005. 300p.

SHIMADZU. **Determinação de Limite de detecção e quantificação em AAS**. NT-003. Disponível em: < www.shimadzu.com.br/analitica>. Acesso em: 05/07/11.

SHUKLA, V. K. S, JENSEN, O. H. Fatty acid composition and tocopherol content of Amazonian palm oils. **Journal of Food Lipids**, n. 3, p. 149-154, 1996.

SILVA, S. M.; SAMPAIO, K. A.; TAHAM, T.; ROCCO, A. S.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Characterization of Oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) Grown in the Brazilian Amazon Region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 611–616, 2009.

SLATTERY, M. L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J. D. Carotenoids and colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 575–582, 2000.

STAHL, W.; HEINRICH, H. J.; SIES, H.; TRONNIER, H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 795–798, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345–351, 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 2161–2166, 1992.

STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.

STÖGGL, W.; HUCK, C.; WONGYAL, S.; SCHERZ, H.; BONN, G. Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, and γ -oryzanol in crude rice bran oil by liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detection employing silica C₃₀ stationary phases. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1712, 2005.

TAN, C. P.; MAN, Y. B. C. Comparative Differential Scanning Calorimetric Analysis of Vegetable Oils: I. Effects of Heating Rate Variation. **Phytochemicals Analysis**, n. 13, p. 129–141, 2002.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.

TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

USDA-United States Department of Agriculture. **Oilseeds: World markets and trade**. Foreign Agricultural Service. Circular Series, oct., 2010. 33p.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VÁSQUEZ-OCMÍN, P. G.; ALVARADO, L. F.; SOLÍS, V. S.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical characterization and oxidative stability of the oils from three morphotypes of *Mauritia flexuosa* L., from the Peruvian Amazon. **Grasas y aceites**, v. 61, n. 4, p. 390-397, 2010.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production.

Process Biochemistry, v. 40, p. 3627–3652, 2005.

WHITE, P. J. **Fatty Acids in Oilseeds (Vegetable Oils)**. In: Chow, C. K (Ed.). **Fatty Acids in Foods and their Health Implications**. 30. ed. CRC Press, 2008.

YE, L.; LANDEN, W.O.; EITENMILLER, R. R. Simplified Extraction Procedure and HPLC Determination for Total Vitamin E and β -Carotene of Reduced-Fat Mayonnaise. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 78-82, 2001.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, p. 63-75, 2003.

ZINGG, J. M. Modulation of signal transduction by vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 5-6, p. 481-506, 2007.

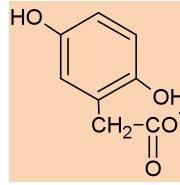
ZINGG, J. M.; MEYDANI, M.; AZZI, A. α -Tocopheryl phosphate – An active lipid mediator?. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 679–692, 2010.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✚ Pesquisa de esteróis;
- ✚ Avaliação da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana;
- ✚ A aplicação da manteiga de muru-muru como substituto da manteiga de cacau na produção do chocolate;
- ✚ A aplicação dos óleos e gorduras na produção de biodiesel.

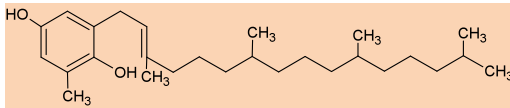
ANEXOS

ANEXO A. Biossíntese de tococromanóis em plantas.

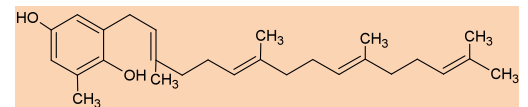


Ácido Homogentísico

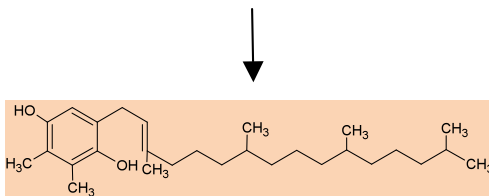
2-metil-6-fetilbenzoquinol/ 2-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol metiltransferase



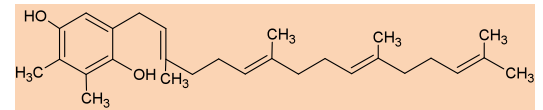
2-metil-6-fetilbenzoquinol



2-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol

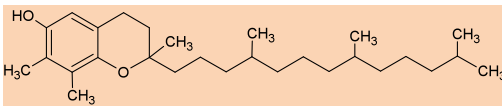


2,3-metil-6-fetilbenzoquinol

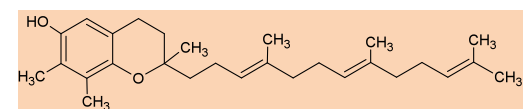


2,3-metil-6-geranilgeranilbenzoquinol

Tocoferol/ Tocotrienol ciclase

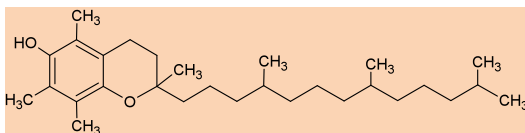


γ-Tocoferol

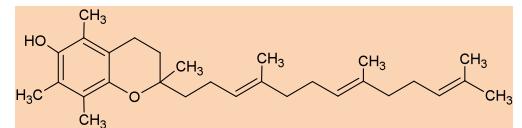


γ-Tocotrienol

Tocoferol/ Tocotrienol metil transferase



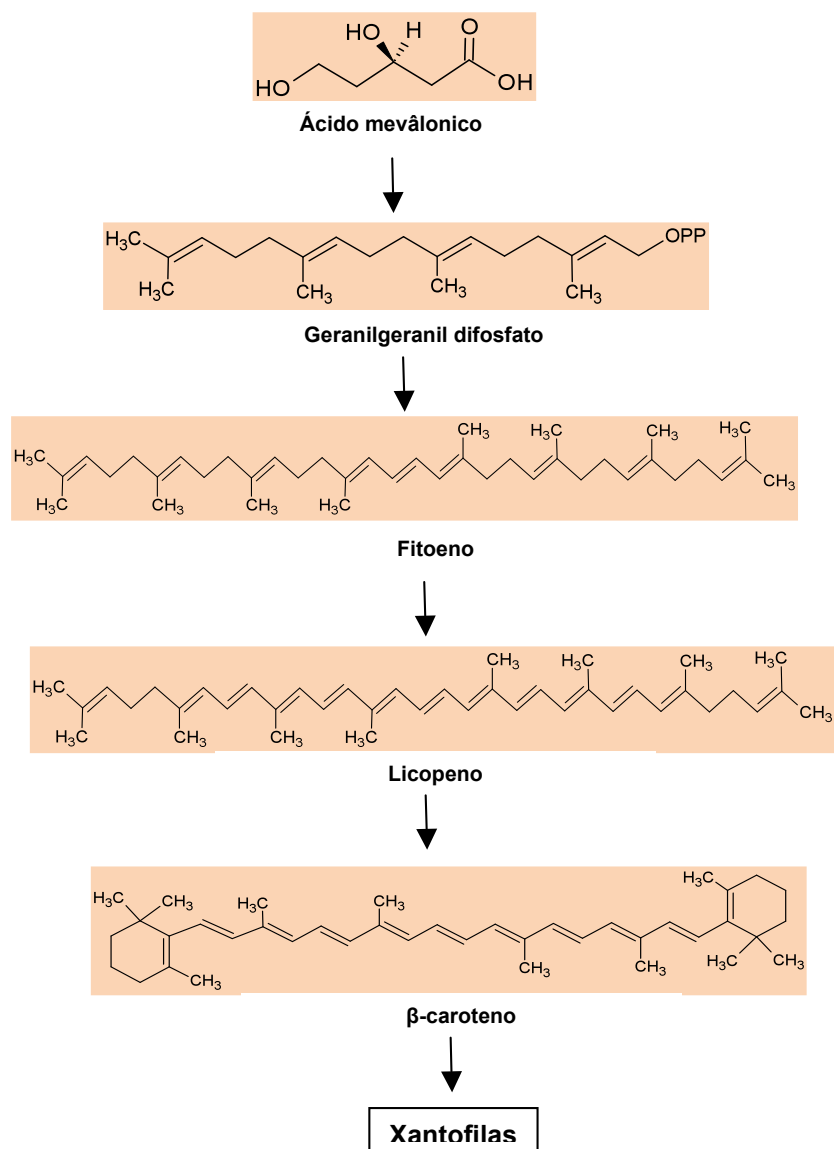
α-Tocoferol



α-Tocotrienol

FONTE: Adaptado de Hunter; Cahoon (2007).

ANEXO B. Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenóides.



FONTE: VALDUGA et al., 2009.

ANEXO C. Protocolo de extração de carotenóides e tococromanóis.

PROCEDIMENTO

- Pesar 1 g da amostra e adicionar 30 mL de etanol contendo pirogalol (6% p/v) um tubo de ensaio, em seguida agitar para evitar aglomeração;
- Adicionar 5 mL de hidróxido de sódio 50% em água deionizada (preparado no mesmo dia) e submeter o tubo a fluxo com nitrogênio por 1 min;
- Submeter essa solução a digestão à 80°C por 30 min em banho-maria sob fluxo e agitação;
- Em seguida, resfriar a solução em banho de gelo;
- Lavar os condensadores com 20 mL de água MiliQ;
- Transferir o material resultante da saponificação para um funil de separação (filtrar antes se necessário). 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;
- Realizar duas extrações em cada amostra utilizando 150 mL e 100 mL de éter dietílico (com 0.003% de BHT), para a amostra e a amostra de referência, respectivamente;
- Descartar o material saponificável e a fração contendo a vitamina lavar quatro vezes com 100 mL com solução de NaCl (2%). Após cada lavagem foi adicionado 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).
- Adicionar 3 g de Na₂SO₄ anidro;
- Filtrar o extrato com um filtro (porosidade de 0.45 µm);
- Evaporar o solvente no rotaevaporador;
- Diluir o extrato em 10 mL de hexano, saturar com N₂ (g) e armazenar a -18°C;
- Injetar 20 µL do extrato no HPLC.

ANEXO D. Determinação do Limite de detecção e quantificação.

Limite de detecção (LD)

$$LD = 3 s_b \cdot C_1 / (x_1 - x_b)$$

onde,

x_1 = área do pico da primeira solução padrão

x_b = média da área do pico da solução de branco de amostra

C_1 = concentração da primeira solução padrão

Limite de quantificação (LQ)

$$LQ = 10 s_b \cdot C_1 / (x_1 - x_b)$$

onde,

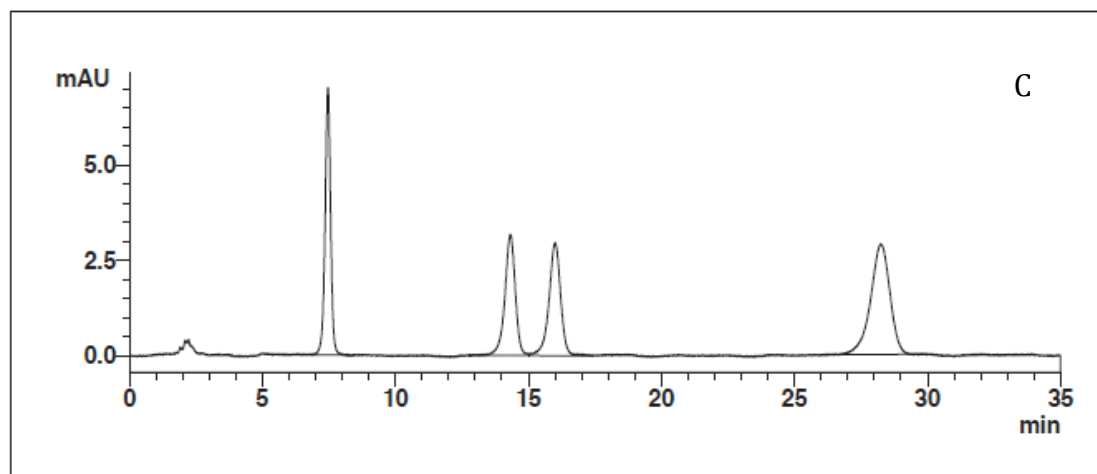
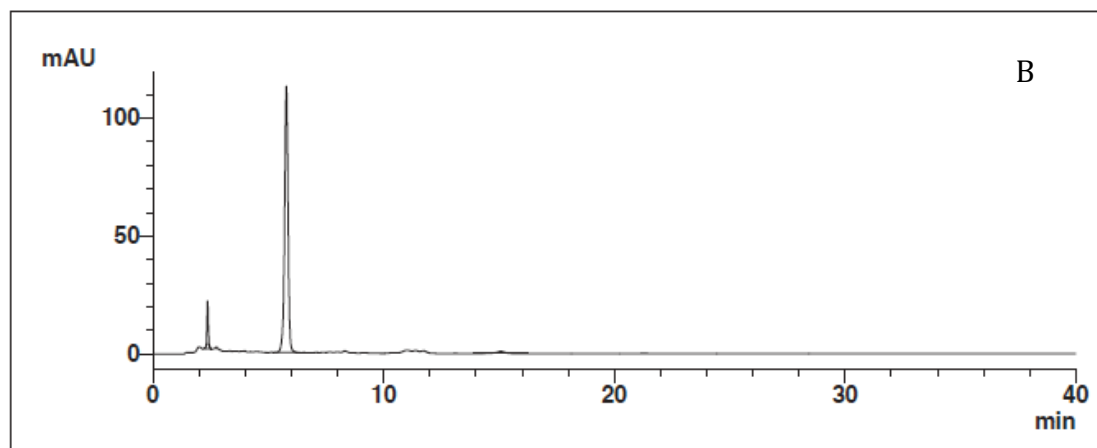
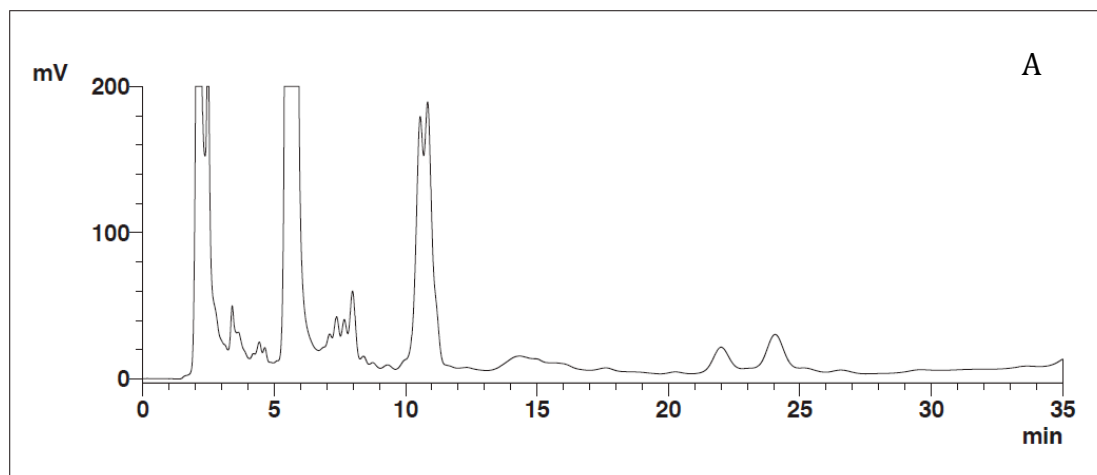
x_1 = área do pico da primeira solução padrão

x_b = média da área do pico da solução de branco de amostra

C_1 = concentração da primeira solução padrão

FONTE: Adaptado de SHIMADZU, 2011.

ANEXO E. Cromatogramas das análises de vitamina E na gordura de ucuúba em detector de fluorescência (A) e detector de arranjo de diodos à 292 nm (B), e o cromatograma dos padrões comerciais de tocoferóis à 292 nm (C). Condições cromatográficas: coluna CLC-SIL com sistema de eluição isocrático, fase móvel hexano: isopropanol (99,5:0,5 v/v); vazão: 1 mL/min.





A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*)

Sylvain Darnet^{a,*}, Josilene L. Serra^b, Antonio Manoel da Cruz Rodrigues^b, Luiza H. Meller da Silva^b

^a Instituto de Ciências Biológicas – ICB – Universidade Federal do Pará, 66.075-900, Belém – Pará, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia – ITEC – Universidade Federal do Pará, 66.075-900, Belém – Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2010

Accepted 20 December 2010

Keywords:

Food analysis

HPLC

α -tocopherol

Vitamin E

Assai

Euterpe oleracea

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the laboratory scale determination of the tocopherol content of assai pulp is reported. This method includes the description of microscale saponification and extraction with diethyl ether. The optimized conditions for reversed-phase HPLC with UV and fluorescence detection were as follows: 250 mm \times 4.60 mm Gemini C18 column with 5 μ m particles, 28 °C column temperature, 95:5 (v v⁻¹) methanol:water mobile phase, 1.0 mL min⁻¹ flow rate and 2.6% method precision for α -tocopherol. To determine the α -, β -, γ - and δ -tocopherol content of fresh pulp, the analyzed assai pulp was collected from three different regions of production in the Amazonian estuary. This study revealed that assai pulp is rich in vitamin E (394.3 μ g g⁻¹ dry matter of α -tocopherol), confirming the nutritional properties of assai.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Euterpe oleracea, popularly known as assai, is a large palm tree endemic to northern South America. Assai fruits are black cherry in color, plum sized and clustered into bunches (Schauss et al., 2006). Their exotic flavor and health benefits have recently increased demand in the American and European markets (David, Carmen, & Stephen, 2004; Lichtenthaler et al., 2005; Mertens-talcott et al., 2008). Assai is high in antioxidants such as phenolic compounds and vitamin E (Kang et al., 2010; Rogez, 2000; Rufino et al., in press). Available information on the vitamin E content of assai pulp, however, is very limited (Lubrano, Robin, & Khaiat, 1994).

Vitamin E, an important natural antioxidant in foods, occurs as eight compounds: α -, β -, γ - and δ -tocopherol and their corresponding tocotrienols. All these forms of vitamin E possess antioxidant activity. The most active form, however, is α -tocopherol (Brigelius-Flohe & Traber, 1999; Traber & Atkinson, 2007). As a scavenger of free radicals, vitamin E is believed to protect the body against degenerative malfunction, particularly cancer and cardiovascular disease (Hasani et al., 2008; Ibrahim, Yusof, Ismail, & Fahami, 2008; Pryor, 2000; Zingg, 2007).

Several methods for the analysis of vitamin E by gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) have been described in the literature (Pyka & Sliwiok, 2001). Sample preparation for the determination of compounds in fruits and vegetables by HPLC can include either or both direct solvent extraction and saponification followed by liquid extraction with organic solvents. Our proposed

method uses saponification without oil for determining the vitamin E content of pulp fruits. Saponification has the advantage of separating the tocopherols from acyl lipids and transforming esters in the corresponding alcohols, easily identified as free compounds, facilitating separation and quantification by HPLC (Gianello et al., 2005). Analysis of tocopherols in fruits by HPLC can employ either normal- or reversed-phase columns (Charoensiri, Kongkachuichai, Suknicom, & Sungpuag, 2009; Chun, Lee, Ye, Exler, & Eitenmiller, 2006; Kim, Giraud, & Driskell, 2007). The advantages of reversed- over normal-phase columns derive from the compatibility of the mobile phase with most biological samples, conferring better stability. Nevertheless, most reversed-phase columns are unable to separate the β - and γ -isomers of tocopherols (Lough & Wainer, 1995), which in fruit pulp is not a limitation due to the low contents of these isomers.

The aims of this work, therefore, were the optimization of chromatographic conditions for measuring tocopherols in assai pulp, the validation of the method and the analysis of representative samples from three locations in the Amazonian region.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The following solvents and chemicals were used as obtained: HPLC-grade methanol, hexane, ethanol, diethyl ether (Merck, Darmstadt, Germany, purity \geq 99.9%), hydroquinone (Sigma-Aldrich, Munich, Germany, purity \geq 99.9%), potassium hydroxide (Sigma-Aldrich, Munich, Germany, purity \geq 90%), stabilized diethyl ether (7 mg BHT mL⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany, purity \geq 99.7%) and α -, β -, γ - and δ -tocopherol standards (Matreya, Pleasant Gap, USA, purity of 95%).

* Corresponding author. Tel.: +55 91 3201 7929; fax: +55 91 32017843.

E-mail address: sylvain@ufpa.br (S. Darnet).

Ultrapure water was prepared using a MilliQ system (Millipore, Billerica, USA). A solution of potassium hydroxide was prepared in methanol (0.5 M). A solution of DL- α -tocopheryl-acetate (Sigma, Steinheim, Germany, purity $\geq 97\%$) (70 mg in 100 mL of ethanol) was prepared fresh daily and stored at -20°C in the dark.

2.2. Equipment

The Shimadzu HPLC system, model LC-10ADVP (Kyoto, Japan), consisted of: LC-10 AD micro-plunger pump, autosampler (SIL-10AF), Gemini C18 Phenomenex precolumn (4.0 \times 3.0 mm internal diameter); Gemini C18 Phenomenex reversed-phase column (250 \times 4.60 mm internal diameter, 5 μm particle size), SPD10AVVP UV-Visible detector, RF10AXL fluorescence detector and LC solution software.

2.3. Biological samples

The fruit (assai, *E. oleracea*) was collected from three different locations (Abaetetuba, Ilha das Onças, Limoeiro) in the state of Para, in the Brazilian Amazonian region. The pulp was separated manually, lyophilized, packed in polyethylene bags and stored in small portions at -20°C until analyzed. The mean water content of the lyophilized pulp (4.85% \pm 0.4%) was used to obtain corrected concentrations in dry matter pulp.

2.4. Standards, internal and external quantification

2.4.1. Standards

Stock standard solutions of α -, β -, γ - and δ -tocopherols were prepared in ethanol (1 mg mL $^{-1}$) and were stored at -20°C in the dark. A solution of DL- α -tocopheryl-acetate (70 mg in 100 mL of ethanol) was used for calibration.

2.4.2. External calibration

An external calibration was performed prior to analyses of assai pulp. All standards of tocopherols (α -, β -, γ - and δ -tocopherols) were injected individually to estimate retention times. Mixtures of the tocopherol standards at nine different concentrations, ranging from 0.5 to 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, were then injected to establish the correlation between peak area and tocopherol concentration.

2.4.3. Internal calibration

The concentration of the DL- α -tocopheryl-acetate working solution was determined using a spectrophotometer (UV 284 nm). A calibrated quantity (7 μg) of the working solution was added to all tocopherol final extracts of assai as an internal calibrator for determination of mass and retention time. In the final extracts, all tocopherols originated from fruit pulp were in their alcohol forms due to saponification step.

2.5. Sample preparation

2.5.1. Saponification and extraction

The content of vitamin E was quantified according to the method reported by Debier et al., with slight modifications for pulp fruits (Debier, Kovacs, Lydersen, Mignolet, & Larondelle, 1999). To avoid destruction of labile vitamins, all work was carried out under subdued light. Hydroquinone was added as an antioxidant, and reactions were flushed with gaseous nitrogen (purity $\geq 99.9\%$) before adding potassium hydroxide. The temperature of saponification was not a limiting factor, because thermal degradation of α -tocopherol only occurs at temperatures $>200^\circ\text{C}$ (Seybold, Frohlich, Bitsch, Tto, & Bohm, 2004). Lyophilized fruit pulp (1 g) was saponified under gaseous nitrogen in flat-bottom flasks with 5 mL potassium hydroxide (50% w v $^{-1}$), 30 mL ethanol (96%) and 100 mg hydroquinone. The flasks were placed at 80°C in a water bath with mechanical agitation for 30 min.

The flasks were then cooled in an ice bath, and water was removed using 12 g anhydrous sodium sulfate for each 100 mL of extract. The liquid-liquid extraction and purification was subsequently performed to extract the unsaponifiable components, including tocopherols, and to eliminate interfering substances remaining in the alkaline aqueous phase, such as fatty acids and glycerols. Unsaponified lipids were extracted several times with 150 mL stabilized diethyl ether. The flasks were shaken, and after separation of the phases, the organic layers were collected in a separation funnel. The organic phases were washed four times with both sodium chloride solution (50 g L $^{-1}$, 100 mL each wash) and MilliQ water (100 mL, several times) until a neutral pH was obtained. This material was then filtered before being dried with a rotavapor at 35°C under gaseous nitrogen. The residue was reconstituted in 10 mL of methanol and was stored at -20°C in the dark. Prior to HPLC analysis, extracts were filtered through a 0.5 μm filter (Millipore, Billerica, USA). Finally, an aliquot of 20 μL was injected into the HPLC column.

2.5.2. Tocopherol recovery after saponification and extraction

To estimate tocopherol recovery, saponification and extraction were performed with a control sample composed of coconut oil (500 μL) (to simulate an oleaginous matrix) and a calibrated mass of DL- α -tocopheryl-acetate (175 μg). The recovery index (%) was based on the ratio of α -tocopherol dosed in the final extract divided by the initial mass of DL- α -tocopheryl-acetate converted in free α -tocopherol.

2.6. Chromatographic analysis

The chromatographic separation of vitamin E was achieved using reversed-phase chromatography at an analytical scale (250 mm \times 4.60 mm internal diameter) with a Gemini C18 column (5 μm particle size) (Phenomenex, Torrance, USA) and a Gemini C18 precolumn. HPLC conditions were as follows: mobile phase 95:5 (v v $^{-1}$) methanol:water, flow rate of 1.0 mL min $^{-1}$ and column temperature of 28°C . The detection was performed by UV (at 284 and 292 nm) and fluorometric detection (at an excitation wavelength of 292 nm and an emission wavelength of 330 nm). The total time between injections was 15 min. Identification of tocopherols was based on retention time (co-injection with standards).

2.7. Statistical analysis

The experimental data were evaluated using ANOVA and a Tukey test (Statistica 7.0, Statsoft, Tulsa, USA).

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation

The liquid-liquid extraction with stabilized diethyl ether was optimized, and results indicated that 95.4% of total tocopherols were recovered with the first extraction (data not shown). The second extraction recovered more (4%) tocopherols, and a third extraction allowed further tocopherol recovery (0.3%). Therefore, three extraction steps were satisfactory to extract all tocopherols after saponification.

3.2. Tocopherol identification

Peak identification was made possible by comparing retention times with standard solutions (α -, β -, γ - and δ -tocopherol), and tocopherol quantification was based on peak areas. The maximum absorption of DL- α -tocopheryl-acetate is at 284 nm and 292 nm, and UV detection was used to detect and quantify this compound. The sensitivity of fluorescence detection (excitation 292 nm and emission 330 nm) is higher than UV detection for free tocopherol isomers and was used to identify and quantify the samples. The limits of detection

(LOD) and quantification (LOQ) were calculated as 3.3 and 10 times the standard deviation of the background noise divided by the slope of the calibration curve, respectively. For all experiments, the LOD was $0.092 \mu\text{g mL}^{-1}$ and, considering a ratio of 1:3, the LOQ was fixed at $0.276 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.76 \mu\text{g g}^{-1}$ dry matter).

3.3. Method validation

A calibration curve was established with nine different concentrations ($0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12$ and $14 \mu\text{g mL}^{-1}$) of mixtures of each tocopherol standard, with established proportions: 90% α -, 7.5% β - + γ - and 2.5% δ -tocopherol (Fig. 1). The linearity of the standard curve (Table 1) was expressed in terms of the correlation coefficient (r) from plots of the integrated peak area (detected with a fluorescence detector) versus the detected concentration of the standard ($\mu\text{g mL}^{-1}$). For all isomers, the coefficient of correlation was greater than 98%, indicating a linear relationship between concentration and peak area.

To estimate the precision of the method, triplicate analyses were conducted for the three different assai pulp samples. Table 2 indicates that the relative standard deviation (RSD) was 10.0% for α -tocopherol, which was greater than the RSD for β - + γ -tocopherol (0.97%). RSD was not determined for δ -tocopherol, which was absent in the extract. International norms, such as the European norm for the determination of vitamin E in food, indicated that for α -tocopherol determination in food, the RSD might be less than 15% (European Union, 2000/45/EC). RSD was higher for β - + γ -tocopherol, which could be explained by the fact that RSD generally increases when the level of detected compounds decrease (Mitra, 2003). In other studies, similar methodologies reported a 5.6% α -tocopherol content in the leaves of *Moringa oleifera* (Sanchez-Machado, Lopez-Cervantes, & Vazquez, 2006).

To record tocopherol recovery, an extraction was performed with a calibration of DL- α -tocopheryl-acetate concentration in an oleaginous matrix. Table 2 shows that the recovery mean was satisfactory (about 83%). The RSD was relatively high (about 7%), which is common in an analytical determination with several steps. Our control was performed with low quantities of tocopherols ($175 \mu\text{g}$ per sample), and the recovery index we obtained was slightly inferior to those reported in other studies. For example, Sanchez-Machado et al. observed a recovery index of 90.3% using a higher concentration of

Table 1
Linearity for the four tocopherols analyzed.

Compound	Range	Equation	r
α -tocopherol	$1\text{--}10 \mu\text{g mL}^{-1}$	$y = 4.158 \cdot 10^{-7}x - 0.3243$	0.9986
β - + γ -tocopherols	$0.3\text{--}1.05 \mu\text{g mL}^{-1}$	$y = 1.912 \cdot 10^{-7}x - 0.0158$	0.9937
δ -tocopherol	$0.1\text{--}0.35 \mu\text{g mL}^{-1}$	$y = 1.259 \cdot 10^{-7}x - 0.0131$	0.9908

x , amount ($\mu\text{g mL}^{-1}$); y , peak area; r , correlation coefficient.

Table 2
Precision and recovery of the proposed HPLC method.

Compound	Precision (n = 3)		Recovery ^a (n = 3)	
	Mean ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM pulp)	RSD (%)	Percent	RSD (%)
α -tocopherol	380.5 ± 10.01	2.63	82.9	6.9
β - + γ -tocopherols	8.84 ± 0.97	3.06	n. det.	–
δ -tocopherol	not det.	–	n. det.	–

^a Recovery was obtained by determining the tocopherol concentration after extraction and chromatography of standard solutions of DL- α -tocopheryl-acetate by the proposed method. n. det.: (not detected). RSD: relative standard deviation.

standard ($628 \mu\text{g mL}^{-1}$ in each sample) (Sanchez-Machado et al., 2006).

3.4. Tocopherol content and α -tocopherol activity

Table 3 displays α -tocopherol composition for the three pulp samples. For all pulp, α -tocopherol was the major component, representing 97.5% of the total tocopherols (Fig. 2). The results are also expressed as an α -tocopherol activity equivalent (α -TE), a unit that is proportional to the antioxidant capacity and absorption level of α -tocopherol in humans. Food values (in α -TE) are obtained by summing all tocopherol concentrations using a coefficient of 1 for α -tocopherol (highest activity), 0.3 for β - + γ -tocopherol and 0.03 for δ -tocopherol (lowest activity) (Monsen, 2000). The mean of α -tocopherol activity for assai is 397.4 α -TE units (Table 3), corresponding to $394.3 \mu\text{g g}^{-1}$ of dry matter (DM) of α -tocopherol and $10.2 \mu\text{g g}^{-1}$ of DM for β - + γ -tocopherol.

da Costa, Ballus, Teixeira, and Godoy (2010) reported α -tocopherol content of $147.72 \mu\text{g g}^{-1}$ in assai, lower than those obtained by our

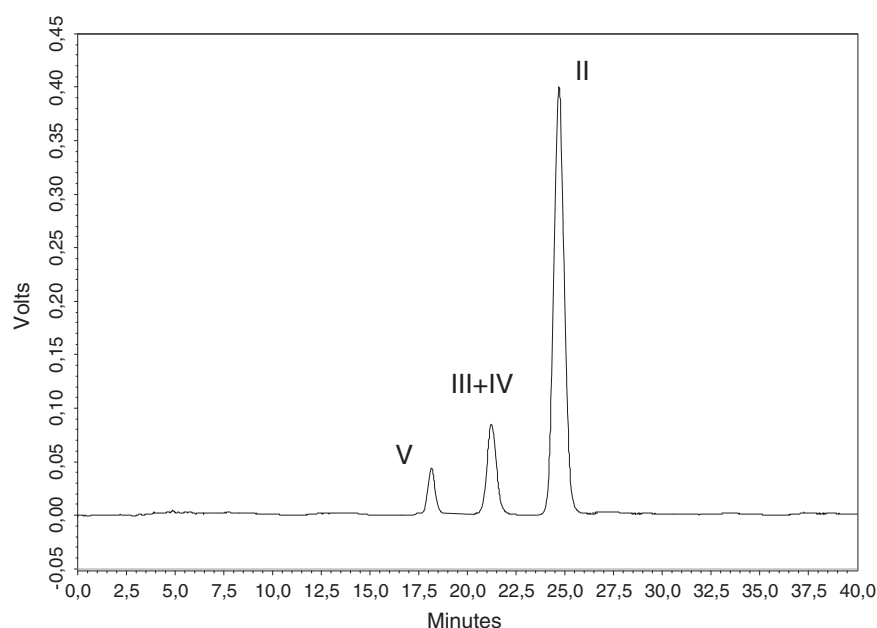


Fig. 1. Chromatogram of standard mixture of tocopherols using a UV detector (292 nm). Peak identification numbers: (II) α -tocopherol ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$), (III + IV) β - and γ -tocopherols ($7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and (V) δ -tocopherol ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC parameters are described within the text (for details see Section 2.6).

Table 3
The α -tocopherol activity and tocopherol composition in assai pulp.

Location	α -tocopherol activity* ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)		α -tocopherol (%)	β - + γ -tocopherols (%)	δ -tocopherol (%)
Abaetetuba	422.06 ^a	± 15.44	97.20	2.80	n. det.
Ilha das Onças	386.98 ^{a,b}	± 13.24	97.55	2.45	n. det.
Limoeiro	383.12 ^b	± 10.12	97.73	2.27	n. det.
Average	397.39	± 12.93	97.49	2.51	–

All results are expressed as mean \pm standard deviation, and all analyses were performed in triplicate. ^{a,b} Groups defined by Tukey test (95%). n. det.: (not detected). * α -tocopherol activity was obtained by summing all isomer concentrations, with a weight of 1 for α -tocopherol, 0.3 for β - + γ -tocopherol and 0.03 for δ -tocopherol.

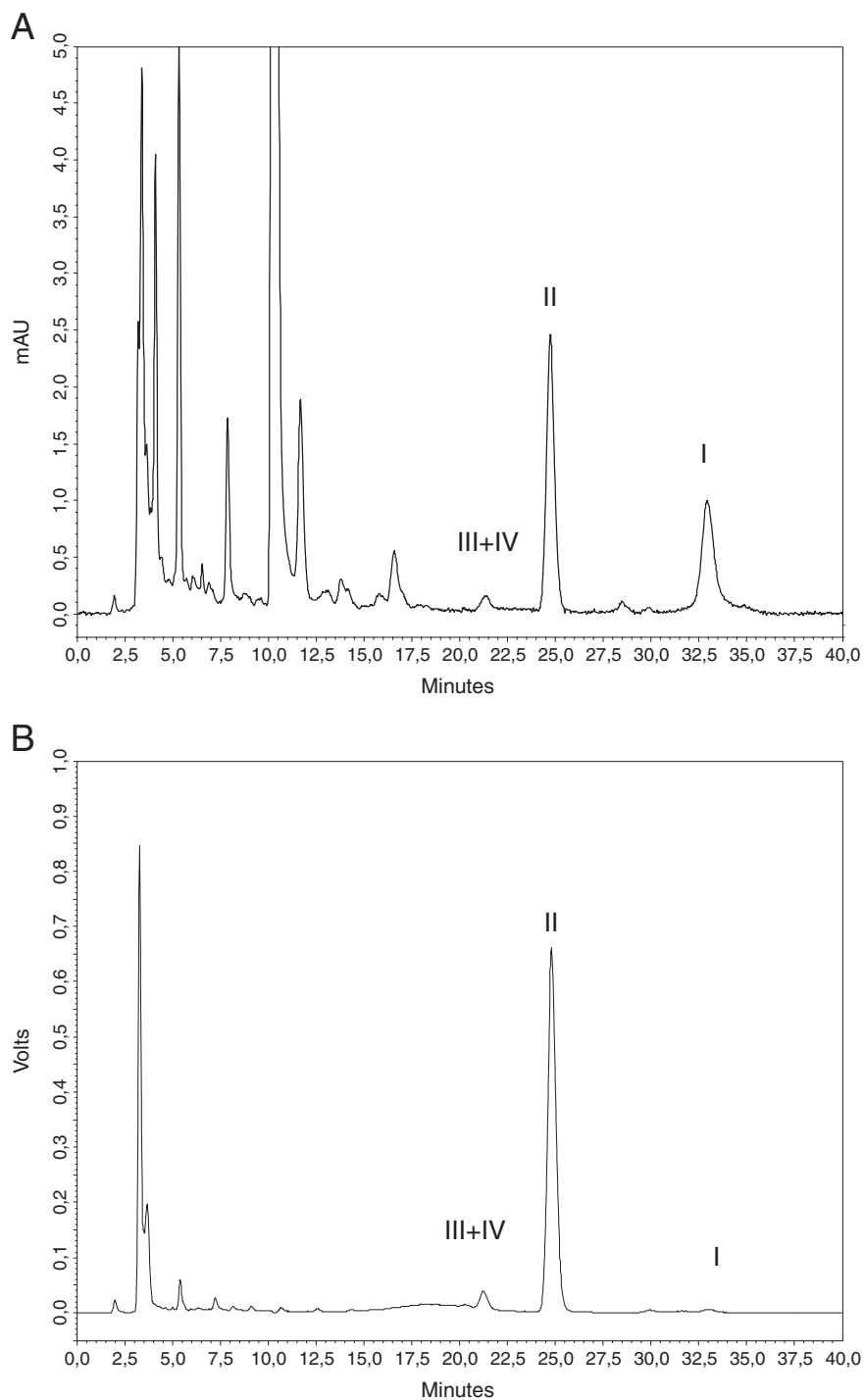


Fig. 2. Chromatogram of tocopherol determination from assai pulp using (A) a UV detector (292 nm) and (B) a fluorescence detector (excitation at 290 nm and detection at 330 nm). Peak identification numbers: (I) DL- α -tocopheryl-acetate, (II) α -tocopherol, (III + IV) β - and γ -tocopherols, and (V) δ -tocopherol. HPLC parameters are described within the text (for details see Section 2.6).

research, probably due to the analysis having been performed directly in unsaponifiable oil. Unlike this study, that analysis was performed directly on pulp fruit. This variation between results can be explained by biological factors, such as differences in geographical origin of the samples, light intensity and duration, chemical and physical properties of the soils and temperature (Ching & Mohamed, 2001; Lubrano et al., 1994). The samples used in our study were collected in the Amazonian estuary, which is a major region of assai production, and in other case, sampling was carried out in different and distant geographical location (Northern Brazil). Our analysis demonstrates that assai fruit pulp is very rich in vitamin E. Most foods derived from plants contain low to moderate levels of vitamin E; most vitamin E is found in leaves, and less is found in fruits, while seeds and nuts have even lower concentrations (Dellapenna & Pogson, 2006). For example, the determination of α -tocopherol in tropical plants showed that the concentration of α -tocopherol could reach $800 \mu\text{g g}^{-1}$ in leaves, while the highest content in fruit was about $150\text{--}300 \mu\text{g g}^{-1}$ in pepper plants. Nuts had concentrations of $310 \mu\text{g g}^{-1}$ (hazelnuts) and $439 \mu\text{g g}^{-1}$ (almonds) (Ching & Mohamed, 2001; Chunhieng, Hafidi, Pioch, Brochier, & Didier, 2008; Ryan, Galvin, O'Connor, Maguire, & O'Brien, 2007). Assai is a good source of vitamin E, with a concentration superior to many cereals and legumes and equivalent to many nuts (peanut, walnut), confirming the high functional and nutritional value of assai pulp).

4. Conclusion

The proposed method is a reliable way to determine tocopherol concentration in assai pulp, and could be used to quantify vitamin E concentrations in other tropical palm fruits, which may allow for the identification of new sources of tocopherols. Our results demonstrate that fresh assai pulp has a high content of tocopherols, confirming the high nutritional value of this fruit.

Acknowledgements

The authors thank Roseana Telles Lins, MSc, for technical help. This research was supported by the project No. 620209-2008-9 of Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brazil, CAPES PROCAD-NF 2008 UFPA-UFSC and a post-doctorate fellowship from SECTAM-Pará (Desenvolvimento Científico Regional/DCR No. 35.0315/2005-1).

References

- Brigelius-Flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: Function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145.
- Charoensiri, R., Kongkachuichai, R., Suknicom, S., & Sungpuag, P. (2009). Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chemistry*, 113(1), 202–207.
- Ching, L. S., & Mohamed, S. (2001). Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3101–3105.
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., & Eitenmiller, R. R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 196–204.
- Chunhieng, T., Hafidi, A., Pioch, D., Brochier, J., & Didier, M. (2008). Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: Phospholipids, tocopherols and sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 1374–1380.
- da Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira, J., & Godoy, H. T. (2010). Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, 43(6), 1603–1606.
- David, D. P., Carmen, H. B., & Stephen, T. T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1539–1545.
- Debier, C., Kovacs, C., Lydersen, C., Mignolet, E., & Larondelle, Y. (1999). Vitamin E and A contents, fatty acid profiles, and gross composition of harp and hooded seal milk through lactation. *Canadian Journal of Zoology*, 77, 952–958.
- Dellapenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 711–738.
- European Union. Commission Directive 2000/45/EC of 6 July 2000 establishing community methods of analysis for the determination of vitamin A, vitamin E and tryptophan in feedingstuffs.
- Gianello, R., Libinaki, R., Azzi, A., Gavin, P. D., Negis, Y., Zingg, J. M., Holt, P., Keah, H. H., Griffey, A., Smallridge, A., West, S. M., & Ogru, E. (2005). Alpha-tocopheryl phosphate: a novel, natural form of vitamin E. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(7), 970–976.
- Hasani, N. A. H., Yusoff, P. A., Khalid, B. A. K., Gapor, M. T. A., & Ngah, W. Z. W. (2008). The possible mechanism of action of palm oil gamma-tocotrienol and alpha-tocopherol on the cervical carcinoma caski cell apoptosis. *Biomedical Research-India*, 19(3), 194–200.
- Ibrahim, I. A. A., Yusof, K., Ismail, N. M., & Fahami, N. A. M. (2008). Protective effect of palm vitamin E and alpha-tocopherol against gastric lesions induced by water immersion restraint stress in Sprague–Dawley rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(2), 73–77.
- Kang, J., Li, Z. M., Wu, T., Jensen, G. S., Schauss, A. G., & Wu, X. L. (2010). Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*, 122(3), 610–617.
- Kim, Y. N., Giraud, D. W., & Driskell, J. A. (2007). Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(6), 458–465.
- Lichtenthaler, R., Rodrigues, R. B., Maia, J. G., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(1), 53–64.
- Lough, W. J., & Wainer, I. W. (1995). *High performance liquid chromatography: Fundamental principles and practices*. New York, USA: CRC press.
- Lubrano, C., Robin, J. R., & Khaiat, A. (1994). Fatty-acid, sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of 6 palm species in French-Guiana. *Oléagineux*, 49(2), 59–65.
- Mertens-talcott, S. U., Rios, J., Jilma-stohlawetz, P., Pacheco-palencia, L. A., Meibohm, B., Talcott, S. T., et al. (2008). Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7796–7802.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. New jersey, USA: John Wiley & Sons.
- Monsen, E. R. (2000). Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: Vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(6), 637–640.
- Pryor, W. A. (2000). Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(1), 141–164.
- Pyka, A., & Sliwiok, J. (2001). Chromatographic separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 71–76.
- Rogez, H. (2000). Açai: *Preparo, composição e melhoramento da conservação*. Belem, Brazil: UFPA editora.
- Rufino, M.S.M., J. P.-J., S., Arranz, R.E., Alves, E. S. d. B., M.S.P., Oliveira., in press. Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil, *Food Research International*.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 85–91.
- Sanchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., & Vazquez, N. J. (2006). High-performance liquid chromatography method to measure alpha- and gamma-tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. *Journal of Chromatography A*, 1105(1–2), 111–114.
- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D., et al. (2006). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8598–8603.
- Seybold, C., Frohlich, K., Bitsch, R., Tto, K., & Bohm, V. (2004). Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7005–7010.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(1), 4–15.
- Zingg, J. M. (2007). Modulation of signal transduction by vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5–6), 481–506.