

Obtenção de Padrões de cis-licopeno e β -criptoxantina para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a Partir de Melão-de-São-Caetano e Caqui

Obtaining cis-lycopene and β -cryptoxanthin Standards for High Performance Liquid Chromatography from Bitter Melon and Persimmon

Sidney Pacheco^a; Ronoel Luiz de Oliveira Godoy^a; Alexandre Porte^{b*};
Jeane Santos da Rosa^a; Manuela Cristina Pessanha Araújo Santiago^a

^aEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Brasil

^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

*E-mail: alexandre_porte@yahoo.com.br

Recebido: 3 de novembro de 2011; Aceito: 27 de fevereiro de 2012.

Resumo

A detecção e quantificação de carotenóides em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) demanda de padrões analíticos com alto grau de pureza. A aquisição comercial destes padrões é morosa e dispendiosa. Além disso, determinados diastereoisômeros não estão disponíveis no mercado e alterações dos compostos podem ocorrer durante seu transporte. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter isômeros *cis*-licopeno a partir de licopeno *todo-trans* de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) e β -criptoxantina a partir de caqui (*Diospyros kaki* L.) para utilização como padrões analíticos na análise de alimentos. Licopeno *todo-trans* extraído do arilo de sementes de melão-de-São-Caetano foi convertido a *cis*-licopeno. A isomerização e separação das frações contendo isômeros do licopeno foram realizadas em coluna cromatográfica aberta de sílica ativada e a verificação da isomerização e o isolamento foram realizados por CLAE. Foram detectados 94,2% de licopeno *todo-trans* entre os carotenóides totais dos arilos de sementes. A isomerização em coluna de sílica aberta ativada produziu 29 isômeros *cis*-licopeno em três frações coletadas. Nas primeiras frações de melão-de-São-Caetano e de caqui foram isolados um isômero *cis*-licopeno e β -criptoxantina com pureza de 91,3% e 92,8%, respectivamente, o que permite seu uso como padrões analíticos para análises. Após 1 ano conservados à -18 °C em ampola de borossilicato selada à vácuo, em ambiente escuro, não houve alteração significativa nas concentrações do *cis*-licopeno e da β -criptoxantina, permitindo ainda seu uso como padrões analíticos. A metodologia empregada mostrou-se viável para a conversão de licopeno *todo-trans* em *cis*-licopenos e para o isolamento e purificação de padrões analíticos para CLAE.

Palavras-chave: *Momordica charantia*. *Diospyros kaki*. Carotenóides. Cromatografia Líquida.

Abstract

Detection and quantification of carotenoids in foods can be carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), but analytical standards must be employed. However, these analytical standards are expensive, some isomers are not available for trade, time consuming between purchase and reception and chemical changes may occur during long transportation. Therefore, the objective of this study was to obtain *cis*-lycopene isomers from all-trans lycopene present in bitter melon (*Momordica charantia* L.) and β -cryptoxanthin from persimmon (*Diospyros kaki* L.), for use as analytical standards in foods analysis. All-trans lycopene extracted from bitter melon seed arils was converted to *cis*-lycopene. The isomerization and separation of the fractions containing *cis*-isomers were done in silica column. Confirmation of isomerization and isolation of *cis*-lycopene were performed by HPLC. A total of 94.2% of all-trans lycopene were detected in the seed arils. Isomerization in silica column produced 29 *cis*-lycopene isomers in 3 fractions collected. In the first fraction, a *cis*-lycopene with a purity of 91.3% was isolated which allows its use as analytical standard for analysis using HPLC. After sample preparation, β -cryptoxanthin was isolated by silica column. Analysis by HPLC revealed β -cryptoxanthin with purity of 92.8%. After one year stored at -18 °C in sealed borosilicate glass ampoule under vacuum, in the dark, no significant change in concentration of *cis*-lycopene and β -cryptoxanthin occurred, still allowing them use as analytical standards. The methodology was feasible for the conversion of all-trans lycopene to *cis*-lycopene and for the isolation and purification of analytical standards by HPLC.

Keywords: *Momordica charantia*. *Diospyros kaki*. Carotenoids. Chromatography. Liquid.

1 Introdução

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) é uma planta pertencente à família das *Cucurbitaceas*. É uma trepadeira muito comum em cercas de plantações rurais e na cidade^{1,2}. Seus frutos e folhas são usados no tratamento de diabetes, diarreia, reumatismo, parasitoses, cólicas e em processos de cicatrização³⁻⁵.

Por outro lado, também é uma planta daninha em plantações de cana-de-açúcar⁶. Além dos prejuízos ocasionados pela competição por água, luz, nutrientes e espaço, há interferência do melão-de-São-Caetano na colheita mecanizada da cana, que

provoca perdas no rendimento das máquinas e na qualidade do produto colhido^{7,8}.

Os frutos maduros abrem-se expondo suas sementes de arilo vermelho. No arilo, encontra-se o licopeno em concentrações que chegam a 96% da concentração dos carotenóides totais^{9,10}.

O licopeno, um dos principais pigmentos lipossolúveis encontrados na natureza, é responsável pela coloração vermelha em frutos como tomate, goiaba vermelha e melancia^{11,12}. Está associado à redução do risco de câncer. Uma associação inversa foi observada entre o nível de

licopeno sérico e a incidência de todos os tipos de câncer em homens de meia idade¹³. O seu alto potencial antioxidante frente aos demais carotenóides está diretamente relacionado com o número de duplas ligações conjugadas presentes em sua estrutura, num total de 11 (Figura 1)¹⁴⁻¹⁶.

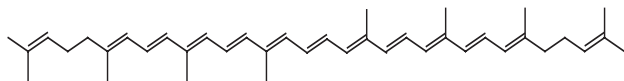


Figura 1: Estrutura química do licopeno

Aproximadamente 80% do teor de licopeno total encontrado na próstata é composto por isômeros *cis*, tendo sido identificados de 14 a 18 diferentes isômeros *cis* neste tecido. No sangue, a concentração de isômeros *cis* representa 50% do total de licopeno¹¹.

A β -criptoxantina (3-hidroxi- β -caroteno) é uma xantofila, estruturalmente muito semelhante ao β -caroteno (Figura 2).

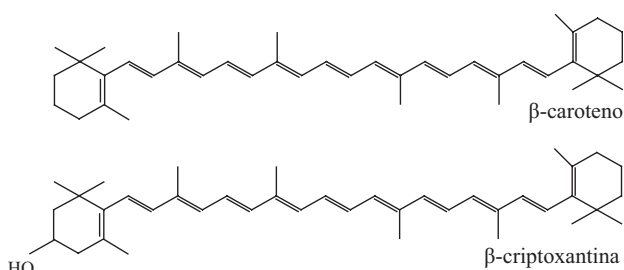


Figura 2: Estruturas químicas do β -caroteno e da β -criptoxantina

A β -criptoxantina também é precursora de vitamina A, no entanto, 1 μ g de β -caroteno equivale a 0,167 μ g de retinol, enquanto que a mesma massa de β -criptoxantina corresponde a 0,084 μ g de retinol¹⁷. Está presente na manga (0,137 mg 100g⁻¹), abacaxi (0,089 mg 100g⁻¹), mamão (0,18-3,182 mg 100g⁻¹) e melancia (0,09-0,48 mg 100g⁻¹)¹⁸. É usada como referência para detectar adulteração de suco de laranja¹⁹.

Numerosos métodos de extração e purificação de xantofilas têm sido propostos, mas geralmente envolvem aquecimento demorado ou uso de enzimas. Enquanto que, no primeiro caso, ocorrem isomerizações e decomposições, no segundo caso, o aspecto financeiro inviabiliza o emprego cotidiano²⁰.

A detecção e quantificação dos isômeros de licopeno e de β -criptoxantina em alimentos e outras matrizes pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com grande exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade se padrões analíticos com alto grau de pureza forem empregados. Todavia, a aquisição comercial destes padrões é dispendiosa e burocrática. Além disso, nem sempre se consegue produzir industrialmente determinado diastereoisômero e alterações dos compostos podem ocorrer durante seu transporte se não

forem mantidas as condições de armazenamento adequadas. Por isso, o objetivo deste trabalho foi obter isômeros *cis*-licopeno a partir de licopeno *todo-trans* contido naturalmente no melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) e de β -criptoxantina presente no caqui (*Diospyros kaki* L.) e posterior isolamento para utilização como padrões analíticos na quantificação da composição isomérica de licopeno e de β -criptoxantina em alimentos.

2 Material e Métodos

2.1 Extração dos carotenóides

Foram abertos com faca oito frutos de melão-de-São-Caetano e os arilos de 40 sementes, retirados manualmente e pesados em balança analítica.

Foram descascados e triturados em mixer vertical 50g de caqui cultivar 'Rama Forte' adquiridos do comércio local para a extração da β -criptoxantina.

As massas pesadas de 8,80 g de arilo de semente de melão-de-São-Caetano e 50 g de caqui foram transferidas para graals de porcelana e adicionadas de uma medida de celite (3 g). A celite, por ser abrasiva auxilia na disrupção das organelas celulares e na extração dos carotenóides. A partir desta etapa, os procedimentos de extração foram idênticos para ambos os compostos²¹⁻²⁴.

O solvente utilizado para a extração dos carotenóides foi acetona resfriada (4 °C) em volume suficiente para cobrir a mistura (cerca de 20 mL). Em seguida, foi realizada a maceração com pistilo e a mistura obtida foi filtrada à vácuo em funil de vidro com placa sinterizada conectado a kitassato de 500 mL.

O sólido retido foi retornado ao graal e nova extração foi realizada com outra porção de acetona resfriada. Este processo foi repetido até que não houvesse mais a percepção da cor característica dos carotenóides na matriz (três repetições foram suficientes).

O extrato líquido recolhido no kitassato foi transferido lentamente para funil de separação de 250 mL contendo 50 mL de éter de petróleo. A mistura foi lentamente lavada com 300 mL de água ultrapura e a fase aquosa inferior foi descartada. Sucessivas lavagens com água foram realizadas até que não fosse mais perceptível o cheiro característico de acetona na água de descarte (três lavagens foram suficientes).

O extrato etéreo foi então filtrado através de funil de vidro raiado contendo uma camada de aproximadamente 3 cm de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão âmbar de fundo redondo de 250 mL e concentrado em evaporador rotatório a 35 °C sob vácuo até cerca de 3 mL.

2.2 Preparo da coluna cromatográfica aberta

Volumes iguais de óxido de magnésio e celite foram misturados, homogeneizados e mantidos em estufa a 110 °C por 4 horas para ativação. Após resfriamento, a mistura foi transferida para coluna de vidro com auxílio de funil para sólidos até atingir aproximadamente dois terços da altura

da coluna. Com o auxílio de uma rolha de borracha furada, a coluna foi conectada a um kitassato de 250 mL. Após o estabelecimento de vácuo no sistema, foi adicionado ao topo da coluna sulfato de sódio anidro suficiente para formar uma camada de 1 cm de espessura. A coluna foi mantida sob vácuo durante 1 hora para melhor compactação. Neste intervalo, foram dadas pequenas batidas com bastão de vidro revestido de borracha para ajudar na compactação²¹⁻²⁴.

2.3 Aplicação e eluição na coluna aberta

Do extrato etéreo obtido, foi retirada uma alíquota de 1 mL para determinação do perfil cromatográfico e o restante foi aplicado em coluna cromatográfica aberta de sílica.

Para a aplicação do extrato etéreo com os carotenóides concentrados, o vácuo foi desconectado do kitassato e, com auxílio de um pipetador automático, o volume restante do extrato foi aplicado no topo da coluna, sobre a camada de sulfato de sódio.

Após a completa absorção do líquido, o vácuo foi lentamente religado e hexano foi adicionado para iniciar a eluição. O vácuo foi ajustado de modo a permitir um fluxo constante da fase móvel, mantendo um gotejamento da coluna de aproximadamente 2 gotas por segundo da fase móvel, que foi adicionada constantemente para não permitir a secagem do topo da coluna.

Após a separação da banda do carotenóide de interesse na coluna, esta foi recolhida em kitassato de 125 mL.

O extrato hexânico do carotenóide isolado foi transferido para balão volumétrico âmbar de 50 mL, passando antes através de funil com sulfato de sódio anidro. Foi adicionada ao balão uma massa de 50 mg de BHT (2,6-di-*ter*-butil-*p*-hidroxitolueno). Por fim, o balão volumétrico foi avolumado com hexano.

Foram separadas e coletadas três frações. Uma alíquota de 1 mL de cada fração foi retirada para determinação cromatográfica. A partir deste ponto, trabalhou-se apenas com o restante da primeira fração²¹⁻²⁴.

2.4 Saponificação do extrato contendo β-criptoxantina

O extrato etéreo foi transferido para erlenmeyer âmbar de 125 mL com tampa e adicionado de hidróxido de potássio metanólico 10% (m/v) em igual volume do extrato.

O frasco foi purgado com nitrogênio para remoção da atmosfera oxidante e foram adicionados 50 mg de BHT. O frasco foi fechado e deixado ao abrigo da luz por 16 horas.

Após o tempo de reação, a mistura foi transferida para funil de separação de 250 mL e a fase superior (etérea) separada e reservada em béquer de 100 mL. A fase inferior foi lentamente retornada ao funil de separação contendo 30 mL de éter etílico e lavada com água ultrapura. O procedimento de lavagem foi repetido três vezes para completa remoção da base.

A fase etérea reservada foi então misturada à solução lavada e retornada ao funil de separação, seguida de quatro

operações de lavagem com água ultrapura.

O extrato obtido foi filtrado através de funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro e recolhido em balão âmbar de 250 mL de fundo redondo para posterior concentração em evaporador rotatório²¹⁻²⁴.

2.5 Análise por CLAE

O restante da primeira fração hexânica foi seco sob fluxo de nitrogênio, ressuspendido em 100 µL de acetona, agitado em vórtex durante 10 segundos e analisada por cromatografia líquida.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba W600, injetor automático 717 Plus e detector de arranjo de fotodiodos 996, todos da Waters®. A coluna utilizada para a separação foi a YCM Carotenoid (Waters®). A temperatura do forno da coluna foi de 35 °C, com fluxo da fase móvel a 0,8 mL/minuto e volume de injeção de 15 µL. O gradiente de eluição com as fases móveis A: metanol e B: éter metil-*terc*-butílico foi: início 80% A e 20% B; 0,5 minuto 75% A e 25% B; 15 minutos 15% A e 85% B; 15,50 minutos 10% A e 90% B; 16,55 minutos até o final 80% A e 20% B²⁴.

Para a determinação da concentração do carotenóide isolado e correção desta concentração pela sua pureza cromatográfica foi usada a equação da Figura 3.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs.} \times \text{Dil.} \times 10000}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \frac{\text{Purz.}}{100}$$

Abs. = valor da leitura de absorvância

Dil. = diluição do extrato (quando usada para faixa de linearidade)

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absortividade molar da β-criptoxantina = 360 e do licopeno = 3450

Purz. = pureza cromatográfica (%)

Figura 3: Equação para o cálculo da concentração corrigida do carotenóide isolado

2.6 Armazenamento do padrão isolado

O padrão obtido foi armazenado a -18 °C (*freezer*) em ampola de vidro selada sob vácuo, em ambiente escuro, e analisado novamente após 1 ano para verificar sua estabilidade.

O solvente da alíquota a ser armazenada foi removido sob fluxo de nitrogênio, com as ampolas em banho de areia a 35 °C para evitar o resfriamento da ampola e consequente condensação de água²⁴.

3 Resultados e Discussão

3.1 Licopeno

Foram quantificados 52,8 mg de licopeno *todo-trans* 100g⁻¹ de arilo das sementes. Isto representa 600 µg de licopeno *todo-trans* /fruto (Figura 4).

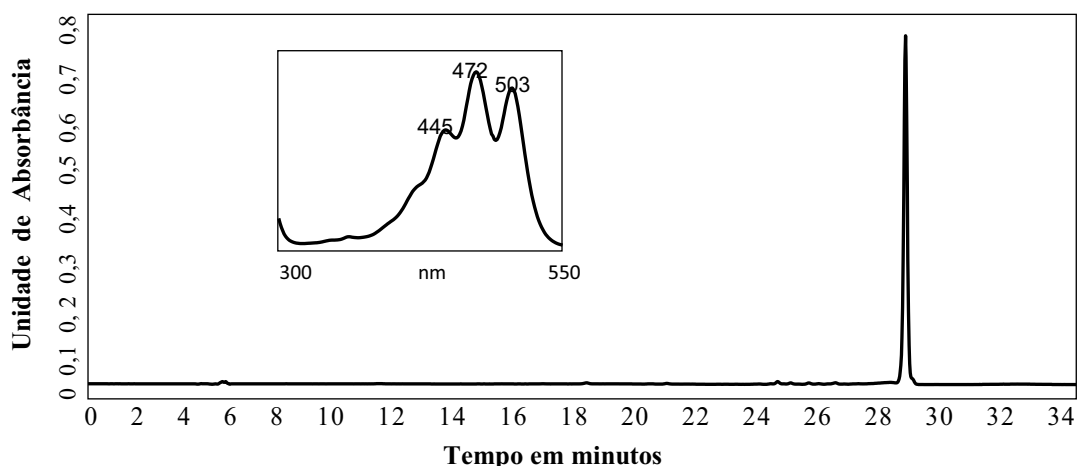


Figura 4: Cromatograma do licopeno *todo-trans*

O extrato etéreo obtido dos arilos das sementes do melão-de-São-Caetano apresentou teor de 94,2% de licopeno *todo-trans* entre os carotenóides totais, confirmando os achados de Tran e Raymundo¹⁰ que revelaram a presença de até 96% deste caroteno entre os carotenóides totais desta planta.

A partir das três frações coletadas após eluição do extrato etéreo na coluna de sílica aberta ativada, foram visualizados 29 isômeros de *cis*-licopeno, mostrando que esta técnica foi eficiente para promover a conversão do licopeno *todo-trans* em isômeros *cis*.

Com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência na primeira fração coletada da coluna de sílica ativada, foi possível o isolamento e a recuperação de um isômero *cis*-licopeno com 91,3% de pureza, quantificado por integração da área do pico em relação à área do cromatograma total, que apresentou absorção máxima nos comprimentos de onda de 359 nm, 440 nm, 466 nm e 497 nm, enquanto o licopeno *todo-trans* apresentou absorção máxima nos comprimentos de onda de 445 nm, 472 nm e 503 nm, respectivamente.

Uma vez que os carotenos são encontrados predominantemente na forma *todo-trans* e, devido à extraordinária facilidade de isomerização *cis-trans*, a existência de isômeros *cis* é difícil de ser revelada²⁵.

A maior dificuldade na análise de carotenóides está na obtenção e conservação dos padrões cromatográficos. Os carotenóides são substâncias reativas, portanto devem ser mantidos a baixas temperaturas, sob atmosfera inerte e ao abrigo da luz²¹.

Este padrão, quando mantido a -18 °C (*freezer*), em ampola de vidro selada a vácuo, em ambiente sem luz não apresentou perda significativa de sua pureza durante 1 ano. A análise cromatográfica revelou recuperação de 100% quando comparado à primeira análise.

O tempo da corrida foi de 36 minutos e o retorno às condições iniciais para nova análise foi de 28 minutos. Isto é importante para a economia de solventes, preocupação comum

em análises de cromatografia líquida de alta eficiência^{26,27}.

A corrida foi realizada a 35 °C. A curva padrão apresentou linearidade, com coeficiente de correlação de 0,9975. A equação da reta dada em função da área do pico (Y) e concentração do padrão (X) foi: $Y=4,14 \cdot 10^5 \cdot X - 6,67 \cdot 10^4$

O coeficiente de variação de triplicatas medidas em sete pontos da curva padrão variou de 0,48 a 5,66%.

O método mostrou-se linear para concentrações de licopeno entre 0,5 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O limite de detecção encontrado foi de 0,012 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o coeficiente médio de variação de 3,62%, enquanto outro trabalho apresentou valores de 0,035 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,1%, respectivamente. Isto comprova que a detecção de menor concentração de licopeno foi possível através do presente estudo, sendo este mais reprodutivo (preciso) que o método apresentado pelos outros autores²⁸.

Futuros estudos empregando outras técnicas são necessários para determinar inequivocamente qual isômero *cis*-licopeno foi obtido, uma vez que o grande número de duplas ligações conjugadas pode facilmente conduzir a enganos na identificação do composto.

3.2 β-criptoxantina

O caqui foi escolhido como matéria-prima para a extração de β-criptoxantina devido ao elevado teor deste pigmento (1,45 mg 100g⁻¹ de fruto fresco)¹⁸ e também por ser este o principal carotenóide do fruto, correspondendo sozinho por até 30% dos carotenóides encontrados²⁹.

Embora o cultivo de caqui tenha uma colheita sazonal, o que limitaria o acesso ao fruto para a realização das extrações de β-criptoxantina, por outro lado, a produção brasileira tem aumentado anualmente. Além disso, o armazenamento a 0 °C permite a conservação por longos períodos sem escurecimento nem amolecimento dos frutos³⁰.

Na purificação de xantofilas, a saponificação pode ser necessária quando elas estão esterificadas ou quando

há elevado teor de lipídeos no alimento. Uma análise cromatográfica preliminar do extrato etéreo pode indicar se há ou não esta necessidade²³.

Neste trabalho, embora o caqui possua apenas 0,4% de

gordura total,³¹ a saponificação foi fundamental, como pode ser observado na Figura 5. No lado A, o perfil cromatográfico do extrato etéreo não saponificado e no lado B, após a saponificação com hidróxido de potássio metanólico.

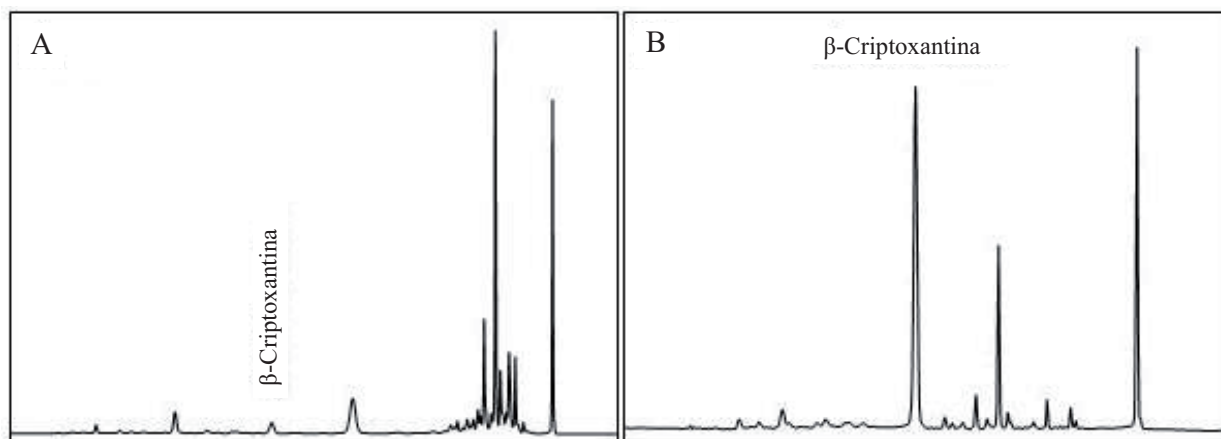


Figura 5: Perfis cromatográficos dos extratos etéreos obtidos de caqui esterificado (A) e saponificado (B)

Em média, 300 µg de β-criptoxantina foram obtidos por cada extração na coluna aberta. O pigmento apresentou absorção máxima nos comprimentos de onda de 450 nm

e 478 nm e pureza de 92,8% detectada por integração da área do pico em relação a área do cromatograma total (Figura 6).

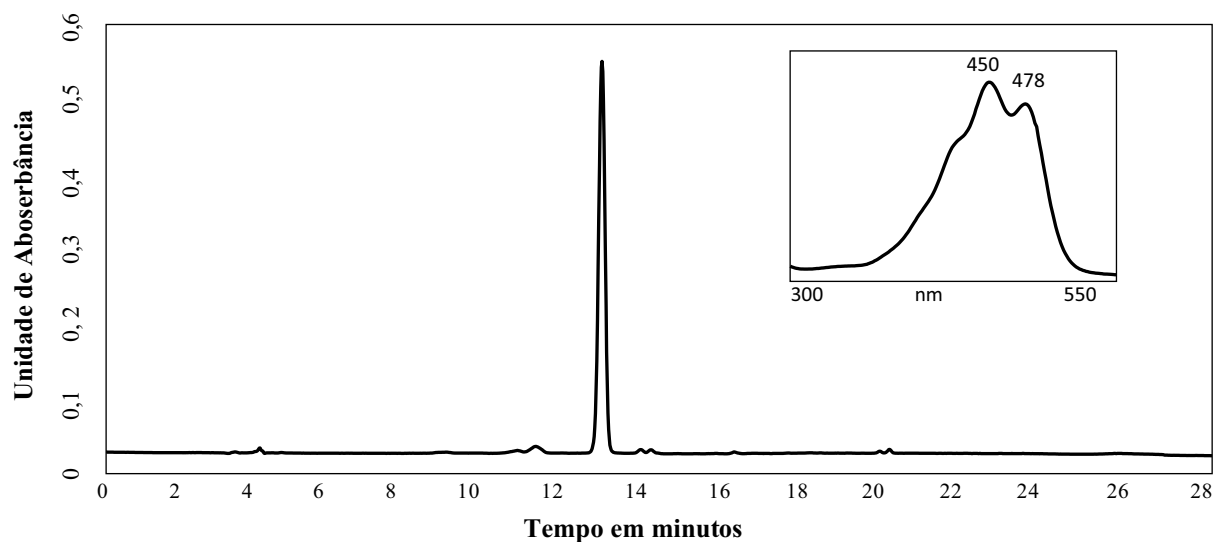


Figura 6. Cromatograma do padrão isolado de β-criptoxantina

A curva padrão apresentou linearidade, com coeficiente de correlação de 0,9974. A equação da reta dada em função da área do pico (Y) e concentração do padrão (X) foi: $Y=4,97.10^5.X - 6,74.10^4$

O coeficiente de variação de triplicatas medidas em sete pontos da curva padrão variou de 0,35 a 3,89%.

O método mostrou-se linear para concentrações de β-criptoxantina entre 0,5 e 8,0 µg mL⁻¹.

O limite de detecção encontrado foi de 0,012 µg mL⁻¹ e o coeficiente médio de variação de 3,62%, enquanto em outro trabalho foi apresentado 0,025 µg mL⁻¹ e 4,1%,

respectivamente. Isto mostra que neste método foi possível detectar menor concentração de β-criptoxantina e que ele foi mais repetitivo (preciso) que no trabalho daqueles autores²⁸.

A β-criptoxantina foi eluída em 18 minutos e a corrida cromatográfica foi realizada em 20 minutos a 35 °C. Esta baixa temperatura diminui os riscos de perda do carotenóide por aquecimento e reduz o tempo de estabilização da coluna para a realização de nova corrida.

Após um ano, a ampola contendo β-criptoxantina foi reanalisada e 96,4% do seu conteúdo foram recuperados,

atestando a estabilidade do padrão sob as condições de armazenamento do estudo.

4 Conclusão

A metodologia empregada neste trabalho logrou êxito em permitir a obtenção de isômero *cis*-licopeno a partir do melão-de-São-Caetano e de β-criptoxantina a partir de caqui, ambos com alto grau de pureza. A técnica também poderá ser aplicada para a obtenção de vários outros padrões analíticos confiáveis de isômeros *cis*-licopeno que atualmente são de acesso comercial moroso e dispendioso e, por isso, dificultam estudos destes pigmentos em alimentos.

Referências

- Jiménez NZA, Montano HG. Detection of phytoplasma in desiccated tissue of *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus* and *Sechium edule*. *Trop Plant Pathol* 2010;35(6):381-4.
- Lenzi M, Orth AI, Guerra TM. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. *Rev Bras Bot* 2005;28(3):505-13.
- Cordeiro LN, Athayde ACR, Vilela VLR, Costa JGM, Silva WA, Araújo MM *et al*. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Rev Bras Pl Med* 2010;12(4):421-6.
- Macedo M, Ferreira AR. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso – Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 2004;14(Supl.1):45-7.
- Pereira BS, Nunes-Pinheiro DCS, Vasconcelos AKP, Pinheiro ADN, Rodrigues PA. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. *Rev Bras Pl Med* 2010;12(3):311-6.
- Christoffoleti PJ, Borges A, Nicolai M, Carvalho SJP, López-Ovejero RF, Monquero PA. Carfentrazone-ethyl aplicado em pós-emergência para o controle de *Ipomea spp.* e *Commelina benghalensis* na cultura de cana-de-açúcar. *Planta Daninha* 2006;24(1):83-90.
- Cardozo NP, Parreira MC, Alves PLCA, Bianco S. Área foliar de duas trepadeiras infestantes de cana-de-açúcar utilizando dimensões lineares de folhas. *Planta Daninha* 2009;27(4):683-7.
- Correia NM, Zeitoun V. Controle químico de melão-de-São-Caetano em área de cana-soca. *Bragantia* 2010;69(2):329-37.
- Rodríguez DB, Tung-Ching L, Chichester CO. Comparative study of the carotenoid composition of the seeds of ripening *Momordica charantia* and tomatoes. *Plant Physiol* 1975;56(5):626-9.
- Tran TLH, Raimundo LC. Biosynthesis of carotenoids in bitter melon at high temperature. *Phytochem* 1999;52(2):275-80.
- Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005;26(6):459-516.
- Shami NJE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr* 2004;17(2):227-36.
- Karppi J, Kurl S, Nurmi T, Rissanen TH, Pukkala E, Nyssönen K. Serum lycopene and the risk of cancer: the Kuopio Schaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) study. *Ann Epidemiol* 2009;19(7):512-8.
- Moritz B, Tramonte VLC. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev Nutr* 2006;19(2):265-73.
- Roldán-Gutiérrez JM, Castro MDL. Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *Trends Anal Chem* 2007;26(2):163-70.
- Vieira EA, Fialho JF, Faleiro FG, Bellon G, Silva MS. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. *Rev Ciênc Agron* 2011;42(2):457-63.
- Brasil. Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 269 de 22 de setembro de 2005. [Acesso em 6 out 2011]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>.
- Khoo HE, Prasad KN, Kong KW, Jiang Y, Ismail A. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Mol* 2011;16(2):1710-38.
- Belitz HD, Grosch W. *Food Chemistry*. Berlin: Springer; 1999.
- Pratheesh VB, Benny N, Sujatha CH. Isolation, stabilization and characterization of xanthophylls from Marigold Flower – *Tagetes Erecta* L. *Mod Appl Sci* 2009;3(2):19-28.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 2002;78(3):389-98.
- Rodriguez-Amaya DB. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI Press; 2001.
- Rodriguez-Bernaldo AQ, Costa HS. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. *J Food Comp Anal* 2000;19(2-3):189-202.
- Tiburski JH, Rosenthal A, Deliza R, Godoy RLO, Pacheco S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Res Int* 2011;44(7):2326-31.
- Pires KMS, Alencar DB, Sousa MB, Sampaio AH, Saker-Sampaio S. Teores de α-caroteno e β-caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. *Rev Ciênc Agron* 2008;39(2):257-62.
- Davis AR, Fish WW, Perkins-Veazie P. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biol Technol* 2003;28(3):425-30.
- Matallo MB, Almeida SDB, Cerdeira AL, Franco DA, Blanco FMG, Menezes PTC, *et al*. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of Shikimic acid from plant tissues. *Planta Daninha* 2009;27:987-94.
- Hart DJ, Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 1995;54(1):101-11.
- Zhou C, Zhao D, Sheng Y, Tao J, Yang Y. Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. *Mol* 2011;16(1):624-36.
- Pinto JAV, Brackmann A, Steffens CA, Weber A, Eisermann AC. Temperatura, baixo oxigênio e 1-metilciclopropeno na conservação da qualidade de caqui “Fuyu”. *Ciênc Rural* 2007;37(5):1287-94.
- Philippi ST. *Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional*. São Paulo: Metha; 2002.