

Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: contribuições de um laboratório brasileiro

Advances in food carotenoid research: contribution of a Brazilian laboratory

RIALA6/987

Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 6121, 13083-970 Campinas, SP

Recebido: 16/02/2004 – Aceito para publicação: 06/09/2004

RESUMO

Os carotenóides são pigmentos naturais, constituintes dos alimentos, sendo alguns deles precursores de vitamina A. São associados com a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata, sendo os compostos bioativos mais estudados. Os nossos estudos vêm contribuindo de maneira significativa para os avanços neste assunto em diversos aspectos. Reconhecidas internacionalmente, as nossas contribuições científicas podem ser agrupadas da seguinte forma: (a) avaliação, otimização e desenvolvimento de métodos analíticos; (b) determinação da composição de carotenóides em alimentos brasileiros, resultando em um extenso e confiável banco de dados; (c) investigação dos fatores que influenciam na composição de carotenóides em alimentos; (d) avaliação dos efeitos de processamento e estocagem de alimentos nos carotenóides; (e) estudo da estabilidade dos carotenóides, inclusive da cinética, dos mecanismos de degradação e do uso de microencapsulação; (f) caracterização de fontes alternativas de carotenóides como flores, leveduras e microalgas. É considerada a pesquisa mais integrada e completa nesta área, em nível mundial.

Palavras-Chave. carotenóides, análise, composição, frutas, vegetais, processamento

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments, constituents of foods, some of which are precursors of vitamin A. They have been associated with the reduction of the risk for degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, macular degeneration and cataract, and have been the most investigated bioactive compounds. Our studies have been significantly contributing to advances in this field in different aspects. Our internationally well-known scientific contributions can be classified into the following categories: (a) evaluation, optimization and development of analytical methods; (b) determination of the carotenoid composition in Brazilian foods, which resulted in an extensive and reliable database; (c) investigation of the factors that influence carotenoid composition in foods; (d) evaluation of the effects of food processing and storage on carotenoids; (e) study of carotenoid stability, including kinetics and mechanisms of degradation, and the use of microencapsulation; (f) characterization of alternative sources of carotenoids such as flowers, yeasts, cyanobacteria and microalgae. Our investigations have been internationally regarded as the most integrated and complete research in this area

Key Words. carotenoids, analysis, composition, fruits, vegetables, processing.

INTRODUÇÃO

Num passado não muito distante, os alimentos eram tidos somente como fontes de substâncias essenciais para o preenchimento dos requisitos nutricionais básicos. Hoje, há uma percepção de que os alimentos oferecem muito mais. Eles são fontes de compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde, como redução do risco de doenças crônicas, fortalecimento do sistema imunológico e desaceleração ou amenização dos males típicos do envelhecimento, dando origem ao novo conceito dos alimentos funcionais. Vários fatores estimularam as investigações neste sentido: os avanços científicos significativos que proporcionaram evidências convincentes ligando a dieta ao estado de saúde, o aumento marcante nos custos hospitalares, o crescimento da população de idosos nos países mais afluentes, os avanços tecnológicos na indústria de alimentos e o aperfeiçoamento da legislação que se tornou mais favorável a comercialização de alimentos funcionais³⁵.

Entre os fitoquímicos bioativos estão os carotenóides. Estes compostos são pigmentos naturais responsáveis pela cor atraente de muitos alimentos como frutas, hortaliças, peixes e crustáceos. A cor de um carotenóide se deve a um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, assim sendo, a cor de um alimento carotenogênico depende dos carotenóides presentes, das suas concentrações e também do seu estado físico. O alimento pode ser amarelo como o milho, onde os principais carotenóides são a luteína e a zeaxantina, ou laranja como as frutas cítricas, onde a β -criptoxantina é majoritária, ou vermelho como o tomate, onde predomina o licopeno. A propriedade corante por si só justificou a intensa investigação sobre carotenóides por muito tempo. A cor é um atributo fundamental na escolha dos alimentos pelos consumidores. Esta pode ser a propriedade sensorial mais importante dos alimentos, com impacto decisivo no julgamento da qualidade global do alimento, influenciando até a percepção de outras características sensoriais como o sabor¹⁷.

Alguns carotenóides são precursores de vitamina A. A vitamina A pré-formada na dieta provém de alimentos de origem animal como fígado, leite e carne. Os alimentos de origem vegetal fornecem carotenóides que podem ser transformados em vitamina A pelo organismo humano. Estima-se que, no âmbito mundial, cerca de 60% da vitamina A alimentar vem das pró-vitaminas A¹¹⁷. Devido ao custo geralmente mais alto dos alimentos de origem animal, a contribuição na dieta das pró-vitaminas A alcança 82% em países em desenvolvimento. Os carotenóides pró-vitâmicos A têm a vantagem de não serem convertidos a vitamina A enquanto o corpo humano não está necessitando, evitando a potencial toxidez do excesso de vitamina A.

Dos mais de 650 carotenóides naturais hoje conhecidos, apenas em torno de 50 são passíveis de serem precursores de vitamina A com base nas suas estruturas. O β -caroteno é a pró-vitamina A mais importante, tanto em termos de biopotência (ao

qual é atribuída 100% de atividade) como pela sua larga ocorrência⁸⁷. Estruturalmente, a vitamina A (retinol) é meia molécula de β -caroteno, com uma molécula adicional de água no fim da cadeia lateral. Um anel β não substituído, com uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos é o requisito mínimo para que um carotenóide possa ter atividade pró-vitâmica A.

A deficiência de vitamina A é um dos três problemas de saúde pública considerados mais sérios, com graves consequências especialmente para crianças dos países em desenvolvimento, segundo os órgãos das Nações Unidas, e com os quais estão comprometidos a diminuir ou eliminar. A deficiência severa leva a cegueira de milhões de crianças e resulta em taxas muito altas de mortalidade (60%). Mesmo a deficiência sub-clínica é associada ao aumento de 23% da mortalidade. A cegueira noturna, provocada pela hipovitaminose A moderada ou severa, em mulheres na idade reprodutiva tem sido recentemente reconhecido como um problema de saúde pública.

Em anos mais recentes, outras atividades biológicas têm sido atribuídas aos carotenóides, como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata^{8,23,47,51,71}. Estes efeitos benéficos à saúde são independentes da atividade pró-vitâmica A e têm sido relacionados à propriedade antioxidante dos carotenóides, mediante o seqüestro de oxigênio singleto e de radicais livres^{46,78}. A capacidade mostrada pelos carotenóides de seqüestrar oxigênio singleto é ligada ao sistema de duplas ligações conjugadas, sendo a máxima eficiência demonstrada para carotenóides com nove ou mais destas duplas ligações²². Outros mecanismos de ação contra doenças têm sido relatados: modulação do metabolismo de cancerígenos, regulação do crescimento e diferenciação celular, inibição da proliferação celular, estimulação da comunicação intercelular, estimulação da resposta imunológica e filtragem de luz azul^{3,70,72}.

As evidências científicas para uma ação biológica de alimentos ou componentes de alimentos provêm de estudos epidemiológicos, estudos biológicos/experimentais e ensaios de intervenção^{18,123}. Na década de 80, numerosos estudos epidemiológicos mostraram forte e consistentemente que a ingestão de β -caroteno ou o nível de β -caroteno plasmático correlacionava inversamente com a incidência de câncer, principalmente câncer de pulmão^{9,124-126}. Esta observação foi apoiada por estudos *in vitro* e em animais. A relação inversa foi também relatada com referência às doenças cardiovasculares^{23,45}. Porém, dois grandes estudos de intervenção realizados na Finlândia⁴ e nos Estados Unidos⁷³ em meados de 90 relataram um aumento na incidência de câncer de pulmão com a suplementação de β -caroteno. Foi reconhecido mais tarde que: (a) Os teores de β -caroteno utilizados nos ensaios de intervenção foram altíssimos (foram administrados diariamente por 5-8 anos no primeiro estudo e 3,7 anos no segundo, cápsulas contendo β -caroteno 5 a 7 vezes a ingestão diária deste carotenóide pela alimentação nos estudos epidemiológicos); (b) Os alimentos teriam outros carotenóides e outros compostos

bioativos que poderiam atuar em conjunto com β -caroteno enquanto que os suplementos continham somente β -caroteno ou β -caroteno com tocoferol no primeiro ensaio e β -caroteno com vitamina A, no segundo; (c) Os participantes eram fumantes ou trabalhadores expostos por tempo prolongado ao amianto, sendo que o processo oxidativo poderia ter atingido uma etapa na qual o carotenóide não teria mais atuação^{11,103}. Em outro estudo envolvendo médicos com baixo consumo de fumo, portanto de baixo risco, a suplementação prolongada com alto teor de β -caroteno não teve efeito adverso³⁶. Já em Linxian, China, uma região de alta incidência de câncer gástrico e de esôfago e de deficiência de micronutrientes, a suplementação conjunta de β -caroteno, vitamina E e selênio diminuiu em 21% as mortes devido ao câncer gástrico¹⁰. Conseqüentemente, os carotenóides reconquistaram sua proeminência, agora com ênfase em carotenóides além do β -caroteno.

As pesquisas do Laboratório de Carotenóides na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, contribuíram de maneira significativa para os avanços na área de carotenóides em alimentos em diversos aspectos. Reconhecidas internacionalmente, as nossas contribuições científicas podem ser agrupadas da seguinte forma: (a) avaliação, otimização e desenvolvimento dos métodos analíticos; (b) determinação da composição de carotenóides em alimentos brasileiros, resultando em um extenso banco de dados confiáveis; (c) investigação dos fatores que influem na composição de carotenóides em alimentos; (d) avaliação dos efeitos de processamento e estocagem de alimentos nos carotenóides; (e) estudo da estabilidade dos carotenóides, inclusive da cinética, dos mecanismos de degradação e do uso de microencapsulação; (f) caracterização de fontes alternativas de carotenóides como flores, leveduras e microalgas. É aparentemente a pesquisa mais completa que existe nesta área, em nível mundial. Os artigos decorrentes dos vários estudos são largamente citados na literatura internacional.

METODOLOGIA ANALÍTICA

A identificação e quantificação dos compostos bioativos em alimentos são imprescindíveis para as investigações sobre alimentos funcionais e para os programas que preconizam dietas saudáveis para a população. Problemas analíticos que resultaram em dados errôneos vêm impedindo o progresso nesta área, inclusive nos estudos epidemiológicos que correlacionam componentes dos alimentos à incidência de doenças.

Vários trabalhos^{7,12,13,25,29,38,41,43,56-58,61,63,64,79,110,114,116,120} foram realizados no nosso laboratório no sentido de desenvolver, avaliar e aprimorar os métodos quantitativos para carotenóides; investigar meticolosamente as fontes de erro e propor medidas para garantir a exatidão dos resultados analíticos; confirmar a identidade ou elucidar a estrutura de carotenóides. Os resultados destes trabalhos são integrados aos de outros grupos em artigos

de revisão^{40,88,89,111}, capítulos de livros^{90,94,106,108}, e em um livro⁹⁷ que se tornou leitura obrigatória em laboratórios de carotenóides no mundo inteiro. Além de garantir a exatidão dos dados quantitativos, a identificação conclusiva dos carotenóides é de suma importância uma vez que a cor e as atividades biológicas estão intimamente ligadas às estruturas⁹⁵.

Por muito tempo, houve grande confusão em relação à adequação e exatidão dos métodos. Embora, mais dados confiáveis sobre carotenóides em alimentos estão sendo gerados atualmente, um volume considerável de dados errôneos ainda persiste na literatura. Isso reflete as dificuldades inerentes a este tipo de análise. Os principais fatores que dificultam a análise de carotenóides são: (a) a existência de um número muito grande de carotenóides, (b) a variação quali e quantitativa na composição de alimentos, (c) a faixa muito ampla de concentrações em que os carotenóides se encontram num alimento, e (d) a susceptibilidade dos carotenóides à isomerização e oxidação durante a análise e estocagem de amostras antes da análise^{88,97}. As principais fontes de erro são: (a) amostras analíticas não representativas, (b) extração incompleta dos carotenóides, (c) perdas físicas dos carotenóides durante as várias etapas, (d) separação cromatográfica incompleta, (e) identificação equivocada, (f) quantificação e cálculos errados, e (g) isomerização e oxidação de carotenóides durante a análise.

Com a introdução de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a impressão transmitida pela literatura internacional foi de que os problemas já haviam sido superados e a análise de carotenóides se tornou uma atividade de rotina. Uma apreciação cuidadosa dos dados publicados, entretanto, mostrava que não era o caso. Publicamos, portanto, um artigo crítico de revisão apontando os problemas que persistiram e os erros que poderiam ser percebidos nos trabalhos publicados, inclusive as limitações dos métodos da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) dos E.U.A. e dos métodos recomendados pela Cooperação em Pesquisa Científica e Tecnológica (COST) da Europa⁸⁸. Este artigo (33 páginas impressas) foi recebido pelo editor em 21 de outubro de 1988 e aceito sem nenhuma modificação em 1 de novembro de 1988. Foi largamente citado e considerado excelente pela comunidade internacional, sendo objeto de várias reuniões da AOAC e COST, influenciando os rumos de análise de carotenóides no âmbito mundial.

Embora sendo a técnica analítica preferida para os carotenóides atualmente, a CLAE tem as suas fontes inerentes de erro: (a) incompatibilidade entre o solvente de injeção e a fase móvel, resultando em picos deformados ou divididos; (b) perdas variáveis de carotenóides na coluna CLAE; (c) picos sobrepostos; (d) pureza variável e instabilidade dos padrões de carotenóides; (e) identificação errônea; (f) inexatidão no preparo das soluções-padrão e na calibração; (g) cálculos errados. Ilustrações destes erros e medidas que podem ser tomadas para evitá-los foram apresentadas em um artigo de revisão⁴⁰.

BANCO BRASILEIRO DE DADOS DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS

Com o seu imenso território e uma grande parte de clima tropical e sub-tropical, que favorece a biossíntese de carotenóides, o Brasil possui uma variedade notável de alimentos ricos em carotenóides. Uma boa parte desta riqueza natural já foi analisada, inclusive produtos processados e alimentos preparados obtidos em restaurantes^{1,2,5,6,14-16,27,30-34,37,42,59,60,62,67-69,76,77,80,81,112,113,115,118,121,122}, proporcionando o mais extenso banco de dados confiáveis sobre carotenóides no mundo^{91,93,100,101,105}. A dimensão desta base de dados pode ser melhor apreciada se for considerado que a grande maioria dos dados vem de um único laboratório. Alguns poucos dados foram obtidos em laboratórios, como os da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por pessoas que foram treinadas no nosso laboratório. O banco de dados dos E.U.A., o segundo mais extenso, constitui-se de dados provenientes de vários laboratórios.

Embora alguns trabalhos nossos tenham focado as pró-vitaminas A, devido à importância destas no combate à deficiência de vitamina A, a maior parte das análises realizadas no nosso laboratório determinou tanto os carotenóides pró-vitâmicos A como os não pró-vitâmicos, muito antes que outros laboratórios comesçassem a determinar também aqueles que não possuíam atividade pró-vitâmica A. Isso colocou o nosso laboratório numa posição de liderança quando o papel dos carotenóides em relação às doenças degenerativas ganhou destaque no mundo.

O nosso banco de dados está sendo usado por pesquisadores de universidades e institutos de pesquisa em áreas como nutrição, epidemiologia, ciência e tecnologia de alimentos, saúde pública e agricultura. São também consultados por técnicos das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Os principais carotenóides encontrados em alimentos são o β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína, licopeno e violaxantina. Os primeiros cinco são também os mais encontrados no sangue humano. Juntamente com a zeaxantina, são os carotenóides já demonstrados como benéficos à saúde humana. Os carotenóides β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina são pró-vitaminas A. A luteína e a zeaxantina são os carotenóides implicados na redução do risco de degeneração macular (principal causa de cegueira no idoso) e catarata⁶⁵. Mais eficiente que o β -caroteno como antioxidante¹⁹, o licopeno mostrou ação contra o câncer, a evidência sendo mais forte em relação ao câncer de próstata, estômago e pulmão²⁴. A possível atuação de violaxantina em relação às doenças ainda não foi demonstrada.

Durante o levantamento da nossa extensa base de dados, vários achados foram alcançados, alguns dos quais chegaram a ser surpreendentes. Buriti³¹ e tucumã¹⁰⁰, alimentos nativos da região amazônica, são fontes riquíssimas de β -caroteno. O buriti tem o maior teor de β -caroteno entre os numerosos alimentos já analisados no nosso laboratório, além de ter também níveis altos de α -caroteno e γ -caroteno, outras pró-vitaminas A. A

pupunha¹⁰⁰ contém δ -caroteno, um carotenóide não pró-vitâmico A, como o principal, mas também tem boas quantidades de β -caroteno e γ -caroteno. Como os lipídios estimulam a absorção dos carotenóides, estes carotenóides de frutas de palmeiras podem ter a vantagem adicional de possuírem maior biodisponibilidade.

A acerola¹⁴, riquíssima em vitamina C, é também uma boa fonte de β -caroteno. Por muito tempo, este carotenóide foi considerado o predominante de manga. O principal carotenóide da manga, na verdade, é violaxantina, que é facilmente perdida durante a análise⁶². De qualquer forma, a manga é uma boa fonte de β -caroteno. Este carotenóide é o majoritário em caju e nêspera, mas os níveis são baixos.

O α -caroteno às vezes acompanha o β -caroteno, mas geralmente em teores menores. São fontes destes dois carotenóides a cenoura e algumas variedades de abóbora e moranga^{1,2,37}.

A β -criptoxantina é o principal carotenóide de muitas frutas com polpa de cor laranja como cajá¹¹³, nectarina³³, mamão laranja³⁹, pêssego¹⁰⁰ e a fruta do pé de tomate¹¹².

A luteína em alta concentração é encontrada na flor comestível de *Tropaeolum majus*⁶⁸. Este carotenóide é também o predominante em verduras folhosas e outros vegetais verdes^{5,6,42,69}, seguido pelo β -caroteno^{5,6,42,69,83}. Algumas variedades de abóbora e moranga^{1,2,37} contêm altos teores de luteína, acompanhada por menores quantidades de β -caroteno.

O tomate e seus produtos, assim como a melancia, são praticamente as únicas fontes de licopeno em muitos países. O Brasil, no entanto, tem além destes^{69,118,121}, a goiaba vermelha^{74,81}, o mamão vermelho³⁹ e a pitanga¹⁴. A pitanga contém também quantidades substanciais de β -criptoxantina, γ -caroteno e rubixantina.

Outros carotenóides predominam em outras frutas como ζ -caroteno em maracujá^{16,57}, violaxantina em abricó¹⁰⁰ e zeaxantina em pequi¹⁰⁰.

FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO EM CAROTENÓIDES

Além das diferenças composicionais entre alimentos, existe variação na composição de um dado alimento. Esta variabilidade natural deve ser conhecida e não deve ser confundida com erros analíticos. Esta informação também auxilia na otimização dos níveis carotenogênicos dos alimentos. Portanto, além de determinar os conteúdos dos carotenóides nos alimentos oferecidos à população, vários dos artigos citados acima investigaram também os fatores que influenciam na composição. Os fatores mais influentes são: (a) variedade ou cultivar, (b) estágio de maturação, (c) clima ou localização geográfica, (d) parte da planta utilizada e (e) técnica de produção¹⁰².

Diferenças qualitativas e principalmente quantitativas ocorrem entre cultivares ou variedades como foi demonstrado

em cucurbitáceas^{1,2,37}, mamão³⁹, manga⁶² e couve⁶⁰.

O amadurecimento de frutas é acompanhado por um aumento marcante na biossíntese de carotenóides, que pode ser visto pela mudança de coloração. Isso foi demonstrado em *Cucurbita moschata* cultivar Menina Verde¹, manga⁶² e acerola¹⁴. Em folhas, o aumento dos carotenóides foi de 3 a 4 vezes na alface e chicória⁶ e ligeira na couve⁵. Em espinafre, porém, as folhas mais jovens apresentaram teores ligeiramente maiores que as mais velhas⁶.

A exposição ao sol e a temperatura elevada favorecem a biossíntese de carotenóides. Portanto, os mesmos cultivares de mamão (Formosa)³⁹ e manga (Keitt)⁶² produzidos no estado da Bahia continham concentrações mais altas que os de São Paulo. Acerolas produzidas no Ceará e Pernambuco apresentaram conteúdos carotenogênicos semelhantes, mas nitidamente maiores do que os da acerola proveniente de São Paulo¹⁴.

Por outro lado, a couve produzida no campo na época de verão teve concentrações mais baixas de carotenóides que a produzida no inverno. Este resultado é compatível com a maior fotodegradação dos carotenóides da folha pela maior exposição ao sol e alta temperatura. De fato, em folhas protegidas por uma cobertura plástica, os teores de carotenóides foram maiores no verão^{5,6}.

Na couve produzida sem uso de defensivos agrícolas, todos os carotenóides alcançaram níveis mais altos do que na couve produzida convencionalmente em local vizinho⁶⁰.

Além da política prevalente de aumentar a produtividade dos alimentos, está ganhando força o pensamento de que os teores de micronutrientes (biofortificação) e outros compostos benéficos a saúde devem ser otimizados por práticas agrônômicas e genética convencional ou por manipulação genética, lembrando-se de que o melhoramento por procedimentos agrícolas tradicionais devem ser tentados antes das técnicas moleculares. Ao nosso ver, a estratégia agrícola só pode ter êxito se for complementada e reforçada pela tecnologia de alimentos^{96,107}. Para isso, o comportamento dos carotenóides em toda cadeia alimentar deve ser conhecido.

ALTERAÇÕES DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM

A cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis dos carotenóides, é também a causa da sua instabilidade. As condições que conduzem à isomerização e oxidação dos carotenóides ocorrem durante o preparo doméstico, processamento industrial e estocagem dos alimentos. Calor, luz e ácidos promovem a isomerização dos carotenóides *trans*, como são normalmente encontrados na natureza, para a forma *cis*, com ligeira perda de cor e atividade biológica. A oxidação, principal causa de degradação dos carotenóides, depende da disponibilidade de oxigênio, tipo de carotenóide e de seu estado físico. É estimulada pela luz, calor, metais, enzimas

oxidativas e peróxidos, e é inibida por antioxidantes. Vários trabalhos foram realizados no nosso laboratório para verificar o comportamento dos carotenóides durante o processamento e estocagem de alimentos^{26,28,75,82,84,119}. Estes trabalhos foram colocados em perspectiva e integrados aos da literatura internacional em um capítulo de livro⁹², um livro⁹⁶ que foi traduzido ao espanhol para distribuição na América Latina⁹⁸ e artigos de revisão^{99,104}.

A isomerização foi bem demonstrada na produção de óleos provenientes de dendê¹¹⁹. Para minimizar a rancidez hidrolítica no óleo, os frutos de dendê devem ser esterilizados imediatamente após colheita visando inativar a enzima lipase. Neste tratamento térmico, porém, ocorre uma perda considerável de *trans-α*-caroteno e *trans-β*-caroteno com aumento dos seus isômeros *cis*.

A oxidação enzimática pode ocorrer nas etapas anteriores ao cozimento ou processamento, quando o alimento é descascado, cortado, ralado ou triturado, pois, a desintegração das estruturas celulares, protetoras dos carotenóides, libera conjuntamente as enzimas e os carotenóides, provocando a oxidação. Este fenômeno pode também ocorrer em verduras minimamente processadas^{5,6}.

A perda da cor e atividade biológica dos carotenóides é uma preocupação no processamento térmico e estocagem de alimentos. A degradação dos carotenóides durante pasteurização e enlatamento foi demonstrada em goiaba⁷⁵, manga²⁶ e mamão²⁸. A perda depende do carotenóide presente, do grau de destruição da estrutura celular e da temperatura e tempo de processamento. Durante a estocagem, a degradação depende da disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, temperatura e tempo. As perdas são minimizadas mediante a aplicação de boas práticas tecnológicas como: processar logo após o corte ou trituração e a escolha mais apropriada do binômio tempo-temperatura durante o processamento, das condições de estocagem e do tipo de embalagem.

No sentido de promover uma fonte de licopeno além de produtos de tomate, o nosso laboratório auxiliou os produtores de goiaba a desenvolver o “guatchup”⁸², na escolha do cultivar com maior conteúdo de licopeno e no monitoramento da perda de licopeno durante o processamento.

CINÉTICA E MECANISMO DE DEGRADAÇÃO

Ao contrário da riqueza de informações existentes sobre a oxidação de lipídios, a oxidação de carotenóides, apesar da sua importância, não está bem elucidada. Presume-se que o primeiro passo é a formação de epoxicarotenóides e apocarotenais. Fragmentações subsequentes levam à formação de compostos de baixa massa molecular, com perda total da cor e atividade biológica, mas passam a formar parte do aroma, agradável em produtos como o chá e o vinho ou desagradável em alimentos como a cenoura desidratada¹⁰⁹. São poucas as evidências para este esquema e os mecanismos não estão estabelecidos.

Em sistemas-modelo de baixa umidade (amido de milho, fécula de batata e celulose cristalina) e aquoso, o α -caroteno, β -caroteno, licopeno e luteína demonstraram predominantemente uma cinética de primeira ordem^{20,21}. O licopeno foi o carotenóide que mais degradou. Em alimentos liofilizados, os carotenóides (α -caroteno e β -caroteno em cenoura, β -caroteno e luteína em salsa, β -caroteno e licopeno em goiaba) também se adequaram numa cinética de primeira ordem. A luz demonstrou ter um efeito preponderante, acelerando a degradação dos carotenóides, tanto nos sistemas-modelo como nos alimentos liofilizados. A grande susceptibilidade do licopeno à degradação, observada nos sistemas-modelo, não se confirmou nos alimentos liofilizados, mostrando a influência marcante da matriz. Este efeito protetor das matrizes alimentares foi também manifestado em relação à luteína, mas não tanto em termos de α -caroteno e β -caroteno.

Em dois trabalhos recentes, a formação de epoxicarotenóides e apocarotenais a partir de β -caroteno e licopeno foram estudados^{85,86}, comprovando a participação destas duas reações como etapas iniciais da oxidação. Como são produtos intermediários, estes compostos não se acumulam, sendo assim encontrados em quantidades extremamente pequenas, o que dificulta a sua detecção e identificação. Utilizando CLAE com detectores de conjunto de diodos e de massas, foram identificados cinco epoxicarotenóides, cinco apocarotenais, uma carotenona, dois hidroxicarotenóides e uma semi-carotenona, provenientes do β -caroteno. Do licopeno, foram identificados oito epoxicarotenóides e seis apocarotenais. Em outros trabalhos, os produtos finais da degradação, que são aldeídos, cetonas e álcoois de 2 a 10 carbonos, foram identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa⁷⁶. Com a identificação dos produtos intermediários e finais da degradação oxidativa, estamos propondo os mecanismos de oxidação, o que significará um grande avanço científico na área.

A tendência atual na preservação de compostos instáveis é a microencapsulação. Dois trabalhos foram realizados sobre a microencapsulação de licopeno^{49,50}, mostrando a grande eficiência da ciclodextrina em proteger o licopeno por tempo prolongado.

FONTES ALTERNATIVAS

Como fonte de carotenóides para a produção de aditivos ou suplementos alimentares, certas fontes naturais não necessariamente comestíveis, mas com teores várias vezes maiores que os encontrados em alimentos, estão sendo procurados mundialmente. No Brasil, as flores, *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonina trilobata*, que crescem espontaneamente e florescem praticamente ao longo do ano inteiro, foram analisadas e comprovadas como sendo fontes muito ricas de luteína⁵³. Os teores de luteína obtidos são comparáveis ou maiores do que os citados para a flor *Tagetes erecta*, a atual fonte comercial deste carotenóide. Uma outra

flor, a *Pyrostegia venusta*, mostrou uma composição complexa, com grandes quantidades de diversos carotenóides, sendo o principal a rubixantina⁵⁴.

A microalga marinha *Tetraselmis gracilis* apresentou oito carotenóides, com luteína como principal⁵². Já na microalga *Synechococcus subsalus*, o β -caroteno e zeaxantina foram os carotenóides majoritários, enquanto que na *Hilea* sp. houve predominância de aloxantina⁵⁵.

Na cianobacteria *Synechocystis pevalekii*, o β -caroteno foi também o carotenóide predominante⁶⁶. Em condições de estresse (redução dos micronutrientes), porém, o β -caroteno diminuiu e a zeaxantina aumentou substancialmente, passando a ser o principal. Estes resultados demonstram que as condições de cultivo podem ser estabelecidas de tal forma a favorecer a biossíntese de carotenóides de difícil obtenção, que são importantes para a saúde humana. Já existem várias fontes comerciais de β -caroteno, mas são raras as fontes de zeaxantina.

Leveduras isoladas no Brasil de amostras de solo, flores, folhas e frutos foram também estudadas⁴⁸. O β -caroteno foi o carotenóide predominante em *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces*, enquanto que o toruleno foi o carotenóide principal de *Rhodotorula mucilaginoso*. A *Rhodotorula glutinis* foi a que apresentou maior concentração de carotenóides.

APLICAÇÃO DOS RESULTADOS

Devido aos nossos estudos pioneiros de avaliação da diversidade de alimentos brasileiros, mostrando os altos teores e ampla gama de valiosos carotenóides para a saúde humana, o Brasil é hoje mundialmente reconhecido por possuir não só uma vasta fonte de carotenóides como pelo volume de informações importantes sobre estes compostos.

Os nossos dados sobre os conteúdos de carotenóides pró-vitamínicos A em alimentos e os efeitos de preparo doméstico, processamento e estocagem vêm sendo utilizados em programas e projetos para o combate da deficiência de vitamina A no Brasil e outros países em desenvolvimento. Está servindo como base de órgãos ou programas internacionais como Opportunities for Micronutrient Intervention, Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Vitamin A Consultative Group, Vitamin A Partnership África e Harvest plus. Breeding crops for better nutrition.

O banco de dados por nós elaborado tem sido utilizado para a promoção de maior consumo de alimentos ricos em pró-vitamina A, inclusive a preservação destes compostos durante o preparo doméstico, processamento e estocagem. Os métodos analíticos que temos desenvolvidos são empregados por vários países para obter dados dos seus próprios alimentos.

Os dados sobre os carotenóides principais de alimentos, incluindo os não pró-vitamínicos A, estão sendo utilizados em estudos epidemiológicos que correlacionam o consumo de carotenóides com a diminuição do risco de

doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular. Estes dados estão sendo também utilizados por produtores brasileiros (como os produtores de goiaba) na escolha de variedades mais ricas em carotenóides para produção e comercialização, e pela indústria de alimentos (como GOIABRAS) na escolha de matérias primas e no desenvolvimento de alimentos funcionais (alimentos promotores e preservadores da boa saúde), que gozam de grande destaque atualmente. Ainda utilizados timidamente, estes dados podem ser eficazmente empregados como “marketing” para frutas e verduras brasileiras, que têm composição excepcional, tanto quali como quantitativamente, no mercado doméstico e internacional.

Os nossos resultados sobre as taxas de degradação de carotenóides e os fatores que influenciam a degradação são usados por várias indústrias alimentícias na tomada de medidas para efetiva retenção destes compostos durante processamento e estocagem de alimentos, evitando a perda da cor (um problema sério que diminui a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores) e das atividades biológicas benéficas dos carotenóides.

Em suma, o impacto da nossa contribuição se estende ao campo do *agribusiness*, à saúde, tanto direta como indiretamente, e à educação do cidadão quanto consumidor de alimentos.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece CNPq, FINEP, FAPESP e CAPES pelos financiamentos e bolsas. Este artigo foi escrito como parte das atividades do projeto PRONEX/CNPq nº 662307/1996-8.

REFERÊNCIAS

1. Arima, H.K.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. **J. Micronutr. Anal.** 4: 177-91, 1988.
2. Arima, H.K.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from Northeastern Brasil. **Arch. Latinoamer. Nutr.** XL(2): 284-92, 1990.
3. Astorg, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends Food Sci. Technol.** 8: 406-13, 1997.
4. ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene) Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in smokers. **New Engl. J. Med.** 330: 1029-35, 1994.
5. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. **J. Sci. Food Agric.** (enviado).
6. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of endive and New Zealand spinach as influenced by maturity, season and minimal processing. **J. Food Comp. Anal.** (enviado).
7. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Comp. Anal.** 17:385-96, 2004
8. Bendich, A. Recent advances in clinical research involving carotenoids. **Pure Appl. Chem.** 66: 1017-24, 1994.
9. Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruits, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer** 18: 1-29, 1992.
10. Blot, W.J. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.** 85: 1483-92, 1993.
11. CARIG. Beta-carotene and the carotenoids. Beyond the intervention trials. **Nutr. Rev.** 54: 185-8, 1996.
12. Carvalho, P.R.N. et al. Determinação de carotenóides e provitamina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Coletanea ITAL.** 21: 317-28, 1991.
13. Carvalho, P.R.N.; Collins, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatogr.** 33: 133-7, 1992.
14. Cavalcante, M.L.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: Charalambous, G. (Ed.). **Food Science and Human Nutrition.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 643-50.
15. Cecchi, H.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **J. Food Sci.** 46: 147-9, 1981.
16. Cecchi, H.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. **Ciênc. Cultura** 33(1): 72-6, 1991.
17. Clysdale, F.M. Color perception and food quality. **J. Food Qual.** 14: 61-74., 1991.
18. Clysdale, F.M. What scientific data are necessary? **Nutr. Rev.** 54: S195-S198, 1996.
19. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274: 532-8, 1989.
20. Ferreira, J.E.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradação de licopeno em um sistema modelo e em goiaba liofilizada. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
21. Ferreira, J.E.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradação de luteína em sistemas modelos e em salsa liofilizada. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
22. Foote, F.S.; Chang, Y.C.; Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. **J. Am. Chem. Soc.** 92: 5216-5218, 1970.
23. Gaziano, J.M.; Hennekens, C.H. The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 691: 148-55, 1993.
24. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.** 91: 317-31, 1999.
25. Godoy, H.T. et al. Confirmation of the structure of papaya B-cryptoxanthin monoepoxide. **Food Chem.** 36: 281-6, 1990.
26. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. **Int. J. Food Sci. Technol.** 22: 451-60, 1987.
27. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. **Lebens. Wissen. Technol.** 22: 100-3, 1989.
28. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comportamento dos carotenóides de purê de mamão (*Carica papaya*) sob processamento e estocagem. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 11: 210-20, 1991.
29. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação das metodologias para determinação de pró-vitamina A. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo.** 29: 17-24, 1993.
30. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **J. Agric. Food. Chem.** 42: 1306-13, 1994.

31. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Burity (*Maurita vitifera*) uma fonte riquíssima de provitamina A, **Arq. Biol. Tec.** 38: 109-20, 1995.
32. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loguati (*Eriobotrya japonica* L.). **Arch. Latinoamer. Nutr.** 45: 336-9, 1995.
33. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Composição de carotenóides em nectarina (*Prunus persica*) brasileira. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 57:73-9, 1998.
34. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 46:3081-6, 1998.
35. Hasler, C.M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technol.** 52: 63-70, 1998.
36. Hennekens et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. **New Engl. J. Med.** 334: 1145-9, 1996.
37. Hess, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Reavaliação da composição de carotenóides em cucurbitaceae por CLAE-DAD e CLAE-EM. **Acta do 5 Encontro de Química de Alimentos. Qualidade, Segurança & Inovação.** Porto: Universidade Católica de Porto; 2001. p. 104-9.
38. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Godoy, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. **Food Chem.** 35: 187-95, 1990.
39. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Yokoyama, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. **Lebens. Wissen. Technol.** 24: 415-8, 1991.
40. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Sources of errors in the quantitative analysis of food carotenoids by HPLC. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 58S-67S, 1999.
41. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.** 78: 389-98, 2002.
42. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 51: 2603-7, 2003.
43. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids of tomato and tomato paste: Verification of the occurrence of *g*-carotene. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 62: 21-6, 2003.
44. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Estabelecimento das condições cromatográficas para análise de carotenóides em alimentos por CLAE: Uma ciência ou uma arte? **Bol. SBCTA** (no prelo), 2004.
45. Kohlmeier, L.; Hastings, S.B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. **Am. J. Clin. Nutr.** 62: 1370S-1376S, 1995.
46. Krinsky, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biol. Med.** 7: 617-35, 1989.
47. Krinsky, N.I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annu. Rev. Nutr.** 13: 561-7, 1993.
48. Maldonado, I.R.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Scamparini, A.R.P. Isolamento e seleção de leveduras produtoras de carotenóides. Trabalho apresentado no **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 1999.
49. Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. **Braz. J. Food Technol.** 5: 197-203, 2002.
50. Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 23 (Supl): 102-5, 2003.
51. Mayne, S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **FASEB J.** 10: 690-701, 1996.
52. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Lourenço, S.O. Carotenóides na microalga *Tetraselmis gracilis*. Trabalho apresentado no **Congresso Latino-Americano de Carotenóides em Alimentos**, Campinas, 1998.
53. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de luteína em flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonina trilobata*. Trabalho apresentado no **Congresso Latino-Americano de Carotenóides em Alimentos**, Campinas, 1998.
54. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. As flores de *Pyrostegia venusta* como fonte alternativa de carotenóides. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on the Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
55. Mello, M.C.; Lourenço, S.O.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determinação da composição de carotenóides em *Synechococcus subsalsus* e *Hillea* sp. Trabalho apresentado na **IV Brazilian Meeting on the Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
56. Mercadante, A.Z. et al. Isolation of methyl 9'-Z-*apo*-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochem.** 41: 1201-3, 1996.
57. Mercadante, A.Z.; Britton, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem.** 46: 4102-6, 1998.
58. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. **Chromatogr.** 28: 249-52, 1989.
59. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.** 25: 213-9, 1990.
60. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. **J. Agric. Food Chem.** 39: 1094-7, 1991.
61. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Desempenho da camada delgada versus camada delgada de alta eficiência multi-desenvolvimento para triagem de carotenóides. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 11: 200-9, 1991.
62. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. **J. Agric. Food Chem.** 46: 128-30, 1998.
63. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Confirmação da identidade de carotenóides minoritários pró-vitâmnicos A em verduras folhosas verdes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 21: 216-22, 2001.
64. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Britton, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. **J. Agric. Food Chem.** 45: 120-3, 1997.
65. Moeller, S.M.; Jacques, P.F.; Blumberg, J.B. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. **J. Am. Coll. Nutr.** 19: 522S-527S, 2000.
66. Muller, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Lourenço S.O. Carotenóides da cianobacteria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação por nutrientes. **Rev. Bras. Ciênc. Far.** (enviado).
67. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. Melancia como fonte de licopeno. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 62: 195-9, 2003.
68. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. (2004) The flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. **J. Food Sci.** (enviado)
69. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. **J. Food Comp. Anal.** (enviado).
70. Olson, J.A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49:7S-11S, 1999.
71. Olson, J.A. Carotenoids. In: Shils, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C. (Eds.) **Modern Nutrition in Health and Disease**, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999, p. 525-41
72. Olson, J.A.; Krinsky, N.I. The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators. **FASEB J.** 9:1547-50, 1995.
73. Omenn, G.S. et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **New Engl. J. Med.** 334:1150-5, 1996.
74. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guava. **Food. Chem.** 20: 11-9 1986.
75. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. **Acta Aliment.** 16: 209-16, 1987.

76. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradation of b-carotene in a low-moisture model system at 30°C. Formation of non-volatile and volatile products. **J. Agric. Food Chem.** (em preparação para publicação).
77. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Moraes, M.A.C. Comparison of the carotenoid composition and general properties of the processed juice of guava cultivar IAC-4 and commercial juices. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 3: 109-16, 1983.
78. Palozza, P.; Krinsky, N.I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. **Meth. Enzymol.** 213: 403-420, 1992.
79. Pereira, M.R.; Amaya-Farfan, J.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação da metodologia analítica para determinação de b-caroteno em macarrão fortificado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 18:35-8 1998.
80. Pereira, M.R.; Amaya-Farfan, J.; Rodriguez-Amaya, D.B. b-carotene content of Brazilian fortified pasta. **Food Control** 10: 81-5, 1999.
81. Porcu, O.; Rodriguez-Amaya, D.B. Goiaba (in natura) e produtos processados de goiaba como fonte de licopeno. **Acta do 5 Encontro de Química de Alimentos. Qualidade, Segurança & Inovação.** Porto: Universidade Católica do Porto; 2001. p. 613-6.
82. Porcu, O.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Efeito do processamento industrial da goiaba nos teores de licopeno e β -caroteno. Trabalho apresentado no **IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2001.
83. Ramos, D.M.R.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** 3: 147-55, 1987.
84. Ramos, D.M.R.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação das perdas de carotenóides e valor de vitamina A durante desidratação e liofilização industrial de espinafre. **Arq. Biol. Tecnol.** 36: 83-94, 1993.
85. Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from b-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed food. **Food Chem.** (em preparação para publicação).
86. Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from lycopene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. **J. Food Sci.** (em preparação para publicação)
87. Rodriguez-Amaya, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. **Bol. SBCTA** 19: 227-42, 1985.
88. Rodriguez-Amaya, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutrient Anal.** 5: 191-225, 1989.
89. Rodriguez-Amaya, D.B. Provitamin A determination - Problems and possible solutions. **Food Nutr. Bull.** 12: 246-50, 1990.
90. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids: Properties and analysis. In: Macrae, R.; Robinson, R.K.; Sadler, M. (Eds.) **Encyclopaedia of Food Science and Nutrition**. Vol. 1. London: Academic Press; 1993. p. 707-13.
91. Rodriguez-Amaya, D.B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous, G. (Ed.). **Shelf-Life Studies of Foods and Beverages**. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 547-89.
92. Rodriguez-Amaya, D.B. Stability of carotenoids during the storage of foods. In: Charalambous, G. (Ed.). **Shelf-Life Studies of Foods and Beverages**. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 591-624.
93. Rodriguez-Amaya, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods - the Brazilian experience. **J. Food Comp. Anal.** 9: 196-230, 1996.
94. Rodriguez-Amaya, D.B. Análisis de carotenoides. In: Moron, C.; Zacarias, I.; Pablo, S. de (Eds.) **Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición**. Chile: FAO; Chile. 1997. p. 231-41.
95. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides: Estrutura, propriedades e funções. In: Rodriguez-Amaya, D. B.; Pastore, G. M. (Eds.). **Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas na América Latina**, Campinas: DCA-UNICAMP, Fundação Cargill: 1997. p. 21-31.
96. Rodriguez-Amaya, D.B. **Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods**. Arlington: Opportunities for Micronutrient Interventions; 1997. 88p.
97. Rodriguez-Amaya, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press; 1999. 64p.
98. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoides y Preparación de Alimentos: **La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados**. Arlington: Opportunities for Micronutrient Interventions; 1999. 99p.
99. Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 38S-48S, 1999.
100. Rodriguez-Amaya, D.B. Latin American food sources of carotenoids. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 74S-85S, 1999.
101. Rodriguez-Amaya, D.B. Brazilian sources of carotenoids. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Natural Colorants**, San Diego, E.U.A. 2000.
102. Rodriguez-Amaya, D.B. Factors influencing carotenoid composition in foods. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Natural Colorants**, San Diego, E.U.A.; 2000. p. 252-63.
103. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides e saúde: Temas atuais. Em: Mercadante, A.Z. et al. (Eds.) **Ciência de Alimentos. Avanços e Perspectivas**, vol. II, Campinas: DCA-UNICAMP; 2001. p. 216-22.
104. Rodriguez-Amaya, D.B. Effects of processing and storage on food carotenoids. **Sight Life Newslett.** (Special Issue), 3: 25-35, 2002.
105. Rodriguez-Amaya, D.B. Brazil: A bounty of carotenoid sources. **Sight Life Newslett.**, 4: 3-9, 2002.
106. Rodriguez-Amaya, D.B. Food carotenoids: Analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. In: Elmadafa, I.; König, J. (Eds.) **Modern Aspects of Nutrition – Present Knowledge and Future Perspectives**. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers; 2002. p. 180-91.
107. Rodriguez-Amaya, D.B. Enhancing the carotenoid levels of foods through agriculture and food technology. FoodAfrica Internet Forum, abril de 2003.
108. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids: Occurrence, properties and analysis. In: Caballero, B.; Trugo, L.; Finglas, P. (Eds.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. London: Elsevier Science Ltda.; 2003. p. 927-36.
109. Rodriguez-Amaya, D.B. Rotas químicas e bioquímicas para a formação de compostos voláteis. Em Franco, M.R.B. (Ed.) **Sabor e aroma: Temas Atuais**. São Paulo: Varela Editora e Livraria; (no prelo), 2004.
110. Rodriguez-Amaya, D.B. et al. Assessment of provitamin A determination by open column - visible absorption spectrophotometry. **J. Chromatogr. Sci.** 26: 624-9, 1988.
111. Rodriguez-Amaya, D.B.; Amaya-Farfan, J. Estado actual de los metodos analiticos para determinar provitamina A. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 42: 180-91, 1992.
112. Rodriguez-Amaya, D.B.; Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. (1983). Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. **Food Chem.** 12: 61-5, 1983.
113. Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M. Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 9: 148-62, 1989.
114. Rodriguez-Amaya, D.B.; Tavares, C.A. Importance of *cis*-isomer separation in determining provitamin A in tomato and tomato products. **Food Chem.** 45: 297-302, 1992.
115. Sá, M.C. de; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.** 83(4): 595-600, 2003.
116. Sá, M.C. de; Rodriguez-Amaya, D.B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables. **J. Food Comp.** 17: 37-51, 2004.
117. Simpson, K.L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. **Proc. Nutr. Soc.** 42: 7-17, 1983.

Rodriguez-Amaya, D. B. Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: contribuições de um laboratório brasileiro. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 63(2):129-38, 2004

118. Tavares, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. **Lebens. Wissen. Technol.** 27: 219-24, 1994.
119. Trujillo-Quijano, J.A.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Esteves, W.; Plonis, G.F. Carotenoid composition and vitamin A values of oils from four Brazilian palm fruits. **Fat Sci. Technol.** 6: 222-6, 1990.
120. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Quantificação de carotenóides de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Rev. Bras. Corantes Naturais.** 1: 145-52, 1992.
121. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Quantificação de -caroteno e licopeno em tomate e em alguns dos seus produtos por CLAE. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 13: 132-41, 1993.
122. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. **Lebens. Wissen. Technol.** 28: 474-80, 1995.
123. World Cancer Research Fund. (1997). **Food, nutrition and the prevention of cancer. A global perspective.** Washington DC: American Institute for Cancer Research; 1997. 670 p.
124. Ziegler, R.G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** 53: 251S-249S, 1991.
125. Ziegler, R.G. et al. Does b-carotene explain why reduced cancer risk is associated with vegetable and fruit intake? **Cancer Res.** (Suppl.) 52: 2060-6, 1992.
126. Ziegler, R.G. et al. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 88: 612-5, 1996.