

FLÁVIA MILAGRES CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE
HORTALIÇAS VISANDO A PRESERVAÇÃO DE
VITAMINA C E CAROTENÓIDES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência da Nutrição, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C198a
2006

Campos, Flávia Milagres, 1978-

Avaliação de práticas de manipulação de hortaliças
visando a preservação de vitamina C e carotenóides /
Flávia Milagres Campos. – Viçosa : UFV, 2006.
viii, 92f. : il. ; 29cm.

Orientador: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Hortaliças - Nutrição. 2. Hortaliças - Composição.
3. Vitamina C. 4. Carotenóides. 5. Alimentos - Análise.
6. Cromatografia a líquido de alta eficiência.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.5

FLÁVIA MILAGRES CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE HORTALIÇAS
VISANDO A PRESERVAÇÃO DE VITAMINA C E CAROTENÓIDES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência da Nutrição, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em 29 de maio de 2006.

Prof.^a. Raquel Monteiro C. de Azeredo
(Co-orientadora)

Prof. Paulo César Stringheta
(Co-orientador)

Prof. José Benício Paes Chaves

Prof.^a. Hércia Stampini Duarte Martino

Prof.^a. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lourdes e Antônio, por todo o esforço que sempre fizeram para minha educação e formação, e assim o fizeram novamente para que eu pudesse completar mais esta fase.

Ao meu irmão, Fabrício, que sempre me ajudou no que podia e dividiu o computador e o quarto comigo, para que eu pudesse trabalhar.

Ao meu namorado, Fabrício, que foi companheiro em todos os momentos bons e ruins e nunca deixou de me ajudar e incentivar.

Aos meus tios, tias e avós pela torcida.

Agradeço à Prof^a Helena, que mais que minha orientadora, foi minha amiga e sempre teve paciência e disponibilidade para ensinar. Obrigada pela confiança!

Ao Prof. José Benício Paes Chaves, pelo interesse, pelas valiosas sugestões que enriqueceram o trabalho desde o início e pela ajuda com o delineamento e análise estatística dos dados.

À Prof^a Raquel Azeredo, que me ajudou a ver o quanto era possível fazer, obrigado pelo interesse no projeto e sugestões.

Ao Prof. Paulo César Stringheta, que sempre me recebeu com atenção, pelas discussões e importantes sugestões na otimização da metodologia e empréstimo de equipamentos.

À Prof^a Céphora Maria Sabarense pela receptividade e ajuda na interpretação e busca de respostas para resultados inesperados.

À Prof^a Sônia, que fez parecer que estávamos aprendendo juntas, pela inestimável ajuda no desenvolvimento da metodologia.

A todos os professores cujos nomes não foram citados, mas que em alguma etapa contribuíram para este trabalho.

Agradeço à Ceres, Daniela, Gardênia e Juliana por toda disponibilidade e amizade; esse trabalho não teria chegado até aqui sem vocês.

A todos os colegas que também utilizaram o Laboratório de Análise de Vitaminas e Laboratório de Pigmentos e Secagem (DTA), pela troca de informações e convivência.

Aos meus colegas de mestrado, Ana Cristina, Cristiane, Ana Paula, Aline, Fabiane, Jôsi, Ciro, André, Edmar, Michele, enfim, todos os companheiros das alegrias e das lamentações inúteis.

Agradeço à Ellencristina por todas as boas risadas e pela amizade.

Aos meus amigos de Viçosa, que entenderam que muitas vezes foi preciso deixar de vê-los para poder concluir as atividades a tempo.

À minha grande amiga Camila, à Natália e Alba, que me receberam em Belo Horizonte e disponibilizaram tudo para que eu pudesse escrever a tese com tranquilidade, e ao Alecsson que cedeu o computador para que eu não parasse nunca. Muito obrigada!

Ao Vinícius, pela ajuda na formatação dos manuscritos.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Nutrição, Solange, Terezinha, Mimorina, Cleusa, Ricardo, Cassiano e Luciano, que me atenderam com bom humor e sempre deram um jeitinho.

À Maria Christina Barros Bittencourt, que disponibilizou a Cozinha Pedagógica.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, D. Lígia, Valério e Tomáz, que sempre me receberam com carinho e não mediram esforços para ajudar.

Aos fornecedores de tomate e couve, que se desdobraram para atender nossas necessidades, pela simpatia e presteza.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de mestrado.

E, por último, agradeço a Deus por ter permitido que eu convivesse com todos vocês e por estar presente em todos os momentos.

CONTEÚDO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 METODOLOGIA	4
3.1 Material	4
3.1.1 Amostras	4
3.1.2 Aparatos	4
3.1.3 Reagentes e outros materiais	4
3.2 Métodos	5
3.2.1 Delineamento experimental e análise estatística.....	5
3.2.2 Preparo das amostras	6
3.2.2.1 Tomate.....	6
3.2.2.2 Couve.....	7
3.2.3 Determinação de sólidos.....	8
3.2.3.1 Sólidos solúveis totais	8
3.2.3.2 Sólidos totais	8
3.2.4 Extração	8
3.2.4.1 Ácido Ascórbico	8
3.2.4.2 Carotenóides	8
3.2.5 Isolamento dos padrões de licopeno e β -caroteno	9
3.2.6 Análise cromatográfica.....	10
3.2.6.1 Curvas-padrão de ácido ascórbico, licopeno e β -caroteno.....	11
3.2.6.2 Análise de ácido ascórbico	11
3.2.6.3 Análise de carotenóides	11
3.2.6.4 Conversão de ácido desidroascórbico em ácido ascórbico	12
3.2.7 Testes de recuperação, linearidade e limite de detecção.....	13
3.2.8 Cálculos.....	13
3.2.8.1 Retenção	13
3.2.8.2 Valor de vitamina A.....	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Artigo 1: Estabilidade de antioxidantes em hortaliças durante o armazenamento e preparo: uma revisão.....	15
4.2 Artigo 2: Otimização de metodologia para análise de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico em hortaliças	31
4.3 Artigo 3: Controle de perdas de vitamina C e carotenóides em tomate durante armazenamento e preparo.....	46
4.4 Artigo 4: Práticas de manipulação para controle de perdas de vitamina C e carotenóides em couve	69
5 CONCLUSÕES GERAIS	92

RESUMO

CAMPOS, Flávia Milagres. M.S. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006. **Avaliação de práticas de manipulação de hortaliças visando a preservação de vitamina C e carotenóides**. Orientadora: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. Co-orientadores: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, Paulo César Stringheta e Céphora Maria Sabarense.

Vitamina C e carotenóides são compostos importantes para a saúde humana. Entretanto, a vitamina C é bastante instável na presença de calor, oxigênio e metais e os carotenóides instáveis na presença de luz e oxigênio. Hortaliças são uma das principais fontes de vitamina C e carotenóides na alimentação, porém os processos a que são submetidas desde a colheita até o consumo podem reduzir seu conteúdo. Acredita-se que a adoção de boas práticas de manipulação poderia minimizar a perda de vitamina C e carotenóides decorrentes das operações de preparo de hortaliças. Os objetivos deste estudo foram otimizar uma metodologia para análise de vitamina C (ácido ascórbico e desidroascórbico), determinar o conteúdo de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico, licopeno e β -caroteno em tomate e couve e selecionar práticas de manipulação para redução de perdas de vitamina C, β -caroteno e licopeno nestas hortaliças durante o armazenamento, pré-preparo, preparo e distribuição para consumo. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método de análise usado para os compostos, sendo que as condições cromatográficas basearam-se em eluição isocrática, separação em coluna de fase reversa e detecção na faixa UV-visível. Para análise da vitamina C, diferentes soluções extratoras e condições cromatográficas foram avaliadas. Muitos dos estudos realizados até o momento não consideraram o ácido desidroascórbico (DHA), embora esse também apresente atividade vitamínica. A quantificação do DHA foi feita de maneira indireta pela sua redução utilizando ditiotreitól (DTT). A metodologia otimizada pode ser empregada também para análise de vitamina C em hortaliças adicionadas de óleo. Para selecionar as práticas de manipulação para prevenção de perdas de vitamina C e carotenóides foram testados o armazenamento à 10 °C e 23 ou 24 °C (durante 24 e 72 horas),

os tempos de sanitização (15, 45 e 75 minutos), os tipos de corte (fatias e cubos para tomate; rasgada e em tiras para couve) e o tempo de exposição para consumo (0, 30 e 60 minutos). As retenções de β -caroteno em couve e de ácido ascórbico (AA) em tomates, após 24 horas de armazenamento, foram maiores em temperatura de refrigeração do que em temperatura ambiente. Já as retenções de DHA e licopeno em tomate foram maiores em temperatura ambiente. A sanitização por tempo superior a 15 minutos influenciou negativamente a retenção de AA nas amostras de couve armazenadas sob refrigeração, sendo cerca de 12 % menor após 75 minutos de sanitização. Não houve diferença entre os cortes e os tempos de exposição empregados para o tomate em relação à retenção de nenhum dos compostos em estudo. O tempo de espera entre a cocção e o consumo da couve refogada influenciou negativamente a retenção de AA tanto na couve fatiada em tiras quanto na couve rasgada. O armazenamento sob refrigeração, o controle do tempo de sanitização e do tempo entre o preparo e o consumo são recomendados para minimizar as perdas de vitamina C e carotenóides tanto em couve quanto em tomate.

ABSTRACT

CAMPOS, Flávia Milagres. M.S. Universidade Federal de Viçosa, May 2006.
Evaluation of vegetable manipulation practices aiming vitamin C and carotenoid preservation. Adviser: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. Co-advisers: Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, Paulo César Stringheta and Céphora Maria Sabarense.

Vitamin C and carotenoids are important compounds for human health. However, vitamin C is very unstable in the presence of heat, oxygen and metals and carotenoids are unstable in the presence of light and oxygen. Vegetables are one of the main sources of vitamin C and carotenoids in the diet. However, the processes they are submitted from harvest to consumption can reduce its content. It is believed that the adoption of good handling practices could minimize vitamin C and carotenoids losses in vegetables during preparation. The objectives of this study were to optimize a methodology for vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) analysis; to determine ascorbic acid, dehydroascorbic acid, lycopene and β -carotene content in tomato and collard green; and, to select handling practices for vitamin C, β -carotene and lycopene loss control in those vegetables during storage and preparation. The analysis method was high pressure liquid chromatography. Chromatographic conditions were based on isocratic elution, reversed phase column separation and UV-visible detection. For vitamin C analysis, different extraction solutions and chromatographic conditions were tested. Studies carried out until this moment did not consider dehydroascorbic acid (DHA), although it also present vitamin C activity. DHA quantification was done indirectly by its reduction with dithiothreitol (DTT). The optimized methodology may also be used for vitamin C analysis in oil added vegetables. Some conditions were tested for the selection of handling practices for vitamin C and carotenoids loss prevention: storage at 10 °C and 23 or 24 °C (during 24 e 72 hours), sanitization time (15, 45 and 75 minutes), slicing method (slices and cubes for tomato; hand torn and strips for collard green) and time before consumption (0, 30 and 60 minutes). The retentions of β -carotene in collard green and ascorbic acid (AA) in tomatoes, after 24 hours of storage, were greater at refrigerated temperature than at room

temperature. On the other hand, the retentions of DHA and lycopene in tomatoes were greater at room temperature. The sanitization for more than 15 minutes negatively influenced the AA retention in collard green samples stored under refrigeration (about 12% less after 75 minutes of sanitization). There were no differences between slicing methods and the times between preparation and consumption used for tomatoes in relation to retention of any compounds under study. The time between cooking and consumption of stir-fried collard green negatively influenced AA retention for both striped and teared collard green. Refrigerated storage, control of sanitization time and control of the time between preparation and consumption are recommended to minimize vitamin C and carotenoids losses in collard green and tomato.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos está relacionada ao seu aspecto e sabor, à segurança sanitária e ao valor nutricional. O aspecto sensorial é logo percebido pelo consumidor, que pode rejeitar o alimento caso esse não lhe agrade. Quanto à qualidade sanitária há grande preocupação dos consumidores em função dos problemas que podem advir de um alimento contaminado. Já em relação à qualidade nutricional, em alguns aspectos a informação é limitada. No caso de micronutrientes, como vitaminas, podem-se selecionar alimentos conhecidos como fontes importantes, mas não há informação suficiente quanto a perdas ocorridas entre a colheita ou abate até a ingestão do alimento.

As vitaminas são nutrientes extremamente lábeis ao processamento dos alimentos, mas que exercem uma ação essencial na regulação das funções do organismo humano (Mindell, 1996). Além dos papéis tradicionalmente atribuídos às vitaminas, no organismo, outras funções vêm sendo destacadas, em especial seu papel antioxidante, bem como o de alguns outros compostos encontrados em alimentos, como os carotenóides (Podsdek, 2006; IOM, 2000). Torna-se, portanto, importante quantificar as perdas desses compostos em alimentos para que a ingestão possa ser calculada com maior confiabilidade, a fim de atingir a recomendação diária.

Além de quantificar as perdas é interessante também buscar medidas para minimizá-las e garantir o valor nutricional do alimento após o preparo. Assim como boas práticas de manipulação são recomendadas para garantir a qualidade sanitária, práticas de manipulação para garantir a qualidade nutricional também podem ser definidas e usadas como parâmetro na produção de refeições em pequena ou larga escala.

A análise química de alimentos é algo complexo e, por isso, muitas vezes a análise de uma vitamina é usada como indicativo do comportamento das demais vitaminas. O ácido ascórbico, por ser uma das vitaminas mais sensíveis, costuma ser utilizado para esse fim (Selman, 1994). No entanto, a comparação com vitaminas lipossolúveis pode ser prejudicada, uma vez que o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel e pode apresentar comportamento distinto frente ao processamento. Desta forma, torna-se importante também a análise de compostos lipossolúveis.

A vitamina C é um nutriente de destaque por causa da sua grande importância em nutrição, para a manutenção da saúde, e para a indústria de alimentos, onde é usada como aditivo em alimentos processados (Rios e Penteado, 2003).

Entre as várias funções desempenhadas pelos carotenóides, a sua atividade provitamínica A é uma das mais importantes. Carotenóides provitamínicos como o β -caroteno podem contribuir com parcela significativa da vitamina A da dieta, especialmente quando se considera o custo financeiro da ingestão de produtos de origem animal, que fornecem a vitamina A pré-formada (Campos & Rosado, 2005). Mas há carotenóides que são acíclicos, como o licopeno, e não apresentam atividade vitamínica (Britton, 1992), porém apresentam outras propriedades. O licopeno é considerado o carotenóide com maior poder antioxidante (Miller et al., 1996).

As hortaliças são fontes muito importante de ácido ascórbico e carotenóides, sendo amplamente consumidas pela população brasileira. Hortaliças como couve e tomate podem ser produzidas e consumidas o ano todo e sua aquisição é acessível para a maior parte da população. Entretanto, o valor nutricional desses alimentos pode ser reduzido durante as diversas etapas a que são submetidos desde a colheita até a ingestão pelo consumidor.

Os fatores que elevam as perdas de ácido ascórbico e carotenóides estão presentes durante o armazenamento, pré-preparo, preparo e distribuição para consumo das hortaliças. Alterações de pH, presença de íons metálicos, exposição ao oxigênio, a temperatura elevada e a luz são os principais fatores que influenciam a estabilidade do ácido ascórbico e de carotenóides (Lee & Kader, 2000; Rodriguez-Amaya, 1997).

Referência bibliográfica

- Britton, G. Carotenoids. (1992). In G. F. Hendry, *Natural foods colorants* (pp. 141-148). New York: Blackie.
- Campos, F. M. & Rosado, G. P. (2005). Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(3), 571-578.
- IOM - U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (2000). *Dietary intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington: National Academy Press.
- Lee, S. K. & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology Technology*, 20, 207-220.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240-242.
- Mindell, E. (1996). O que é importante saber sobre as vitaminas. In Mindell, E., *Vitaminas: guia prático das propriedades e aplicações* (pp.14-29). São Paulo: Companhia Melhoramentos.
- Podsedek, A. (2006). Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A review. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* (no prelo).
- Rios, M. D. G. & Penteado, M. V. C. (2003). Vitamina C. In Penteado, M. V. C., *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos* (p 201-225). São Paulo: Manole.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1997) *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Washington: OMNI.
- Selman, J. D. (1994). Vitamin retention during blanching of vegetables. *Food Chemistry*, 49, 137-147.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Contribuir para a qualidade nutricional dos alimentos e consequentemente melhorar a ingestão de nutrientes pela população, por meio da preservação de vitamina C e carotenóides durante a manipulação de hortaliças.

2.2. *Objetivos específicos*

- Otimizar uma metodologia para análise de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e vitamina C total em tomate, couve crua e couve refogada.
- Quantificar os conteúdos de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico, vitamina C total, licopeno, β -caroteno e valor de vitamina A de couve e tomate, antes e após diferentes condições de armazenamento, higienização, fatiamento e distribuição;
- Avaliar práticas de manipulação rotineiramente utilizadas para tomate e couve, identificando as que permitam melhor preservar a vitamina C e os carotenóides nas hortaliças.

3. METODOLOGIA

3.1. Material

3.1.1. Amostras

Tomates (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Santa Cruz, foram adquiridos de um produtor da cidade de Viçosa, MG. Para a primeira etapa do experimento empregou-se tomate colhido entre agosto e setembro de 2005. Para a segunda etapa, os tomates foram colhidos entre novembro e dezembro de 2005, ambos cultivados em condições semelhantes ao longo do experimento. Os tomates foram colhidos no mesmo dia das análises, sendo escolhidos aqueles tomates visualmente maduros, simulando a utilização imediata para consumo.

A couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) cultivar Manteiga também foi adquirida de um produtor local da cidade de Viçosa, MG. As amostras foram colhidas em setembro de 2005 para a etapa 1 e entre outubro e novembro de 2005 para a etapa 2.

As amostras de couve e tomate foram transportadas até o Laboratório de Análise de Vitaminas da Universidade Federal de Viçosa, embaladas em sacos plásticos, em temperatura ambiente.

3.1.2. Aparatos

Um refratômetro digital marca Hexis foi usado para determinação de sólidos solúveis totais.

Para homogeneização das amostras utilizou-se processador doméstico Faet Multipratic modelo MC5 e para trituração foi empregado microtritador Marconi modelo MA 102.

Para preparo da fase móvel foram usados vibrador ultrassônico, pHmetro Denver, modelo Ub10, sistema de filtração All Glass e utilizadas membranas de filtração de 0,45 µm de porosidade.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, modelo SCL 10AT VP) empregado para análise de ácido ascórbico e carotenóides foi composto de:

- bomba de alta pressão, modelo LC-10AT VP;
- injetor automático com “loop” de 50 µl, modelo SIL-10AF;
- detector de arranjo de diodos UV-visível modelo SPD-M10A.

O sistema foi controlado pelo “software” Multi System, Class VP 6.12.

3.1.3. Reagentes e outros materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: metanol e acetonitrila (Tedia, USA), acetato de etila (Mallinckrodt, USA), ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Alemanha) e ácido acético (Vetec, Brasil). A água ultrapura foi produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, USA). Reagentes grau de pureza para análise (p.a.): ácido metafosfórico (AMP) (Merck, Alemanha), ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Mallinckrodt, USA), tampão Trizma (Nuclear, Brasil), sal etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido fosfórico (H₃PO₄) (Proquímios,

Brasil), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Sinth, Brasil), acetona, éter de petróleo, éter etílico, sulfato de sódio anidro, celite e óxido de magnésio.

A filtração das amostras foi realizada em papel de filtro de 9 cm (Quanty, Brasil) e antes da injeção as amostras e soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 μm de porosidade (Millipore, Brasil).

O padrão de ácido L-ascórbico foi adquirido da Vetec (Brasil). Os padrões de licopeno e β -caroteno foram isolados por cromatografia de coluna aberta.

3.2. Métodos

3.2.1. Delineamento experimental e análise estatística

O estudo foi dividido em duas etapas, tendo em vista as condições de laboratório para as determinações de vitamina C e carotenóides. A Figura 1 apresenta um esquema das etapas 1 e 2 do estudo.

Etapa 1 – Nesta etapa foram testados os efeitos das condições de armazenamento em ambiente refrigerado, a 10°C, e em temperatura ambiente, a 23 °C ou 24 °C, e o tempo de imersão em solução sanitizante (15, 45 e 75 minutos). Amostras de cada hortaliça foram embaladas e armazenadas nas condições de armazenamento descritas (tratamentos). As análises de vitamina C e carotenóides foram realizadas imediatamente após a recepção (antes do armazenamento); após o armazenamento por 24 horas, em temperatura ambiente e em refrigerador, antes da imersão em solução sanitizante e logo após transcorrido o tempo de imersão. Nesta etapa foram realizadas três repetições tanto para couve quanto para tomate.

Etapa 2 – Nesta etapa foram testados os efeitos das condições de armazenamento, em ambiente refrigerado e em temperatura ambiente (24 horas para couve e 72 horas para tomate), o tipo de corte da hortaliça para preparo e o tempo de espera entre o término do preparo e a distribuição (0, 30 e 60 minutos). As amostras foram analisadas imediatamente após a recepção, após o armazenamento, logo após o fatiamento e depois de transcorrido o tempo de exposição após o preparo. Nesta etapa foram feitas cinco repetições para cada hortaliça.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, com as duas condições de armazenamento nas parcelas e o tempo de imersão nas sub-parcelas, na etapa 1. Na etapa 2 as duas condições de armazenamento e os dois tipos de corte foram organizados em arranjo fatorial, nas parcelas e o tempo de espera nas sub-parcelas.

A análise de variância e demais testes estatísticos foram realizados utilizando procedimentos do SAS (Statistical Analysis System), licenciado para a UFV, 2005 (SAS, 1994).

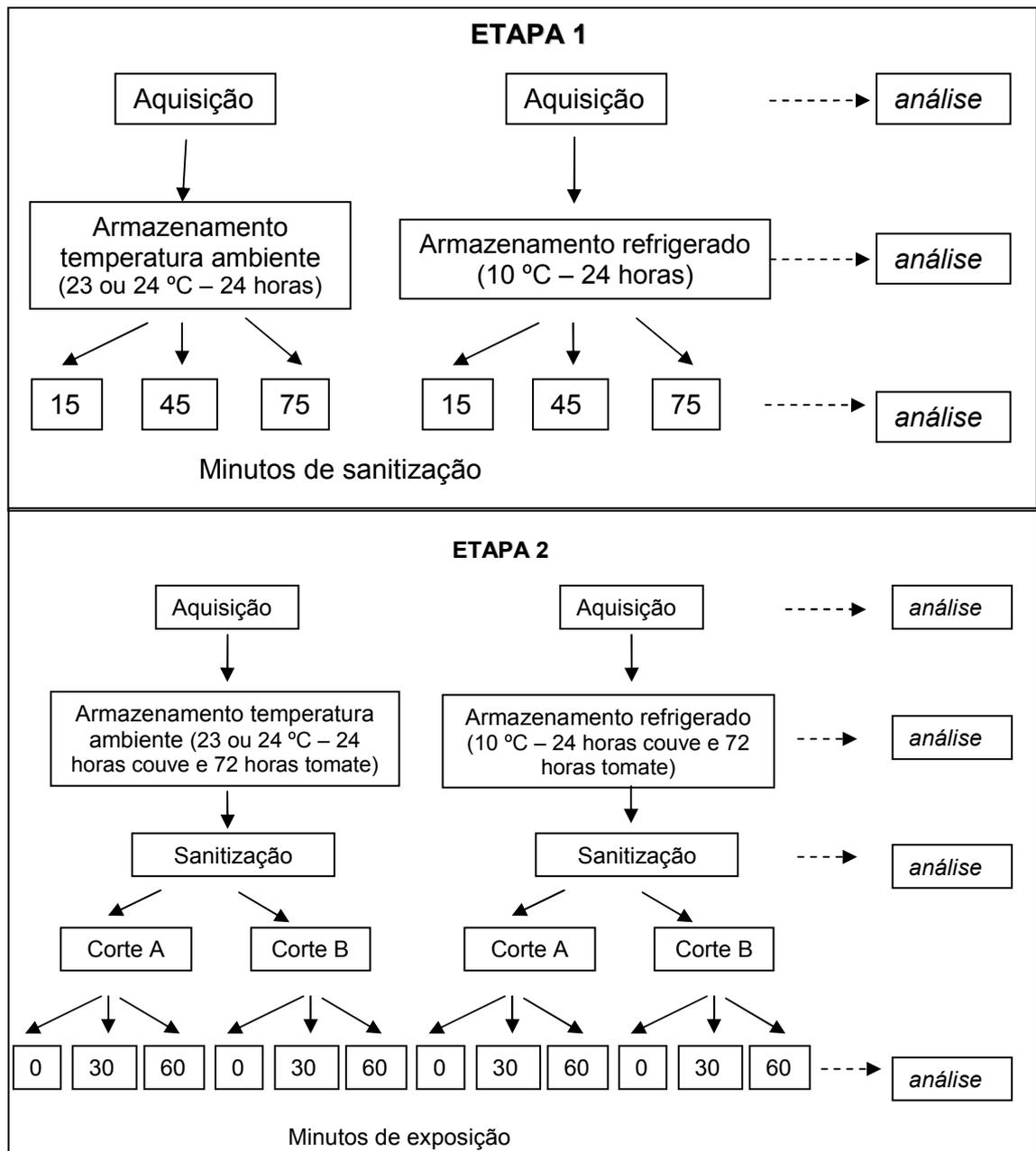


Figura 1. Esquema de análise e tratamentos das fases 1 e 2. Corte A: couve rasgada e tomate em meia-rodela. Corte B: couve em tiras e tomate em cubos.

3.2.2. Preparo das amostras

3.2.2.1. Tomate

Cerca de 6 unidades de tomate (aproximadamente 1 Kg) foram lavados em água corrente, secos com papel toalha, homogêneos em processador tipo doméstico e analisados logo após sua chegada ao laboratório, constituindo o “controle”.

Na etapa 1, entre 6 e 7 unidades de tomate por tratamento foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas nas condições de armazenamento descritas anteriormente, por 24 horas (simulando o tempo utilizado na prática). As temperaturas no início e no final do armazenamento

foram registradas. Após 24 horas essas amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15, 45 e 75 minutos. A solução sanitizante foi preparada conforme recomendação do fabricante do produto clorado: 6,6 g de sanitizante em pó para cada litro de água. O volume preparado para cada repetição foi suficiente para cobrir completamente os tomates.

Após o tempo de sanitização especificado, os tomates foram enxaguados em água corrente e secos com papel toalha. Imediatamente após, os tomates foram homogeneizados com o auxílio de um processador, para em seguida ser retirada uma alíquota para análise.

Na etapa 2, seis a sete tomates, para cada tratamento, foram embalados e armazenados por 72 horas. Depois de transcorrido este período as amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15 minutos. Em seguida foram enxaguadas em água corrente, secas em papel toalha e fatiadas manualmente. Para obter amostras semelhantes, cada unidade de tomate foi cortada ao meio, de forma que cada fruto fosse picado segundo as duas formas em teste: a) em cubos de cerca de 3 cm x 3 cm e b) em fatias de cerca de 1 cm de espessura. Os tomates assim picados foram acondicionados em vasilhames de polietileno sem tampa e permaneceram expostos em temperatura ambiente (média de 24 °C) por 0, 30 e 60 minutos.

3.2.2.2. Couve

Na etapa 1, dois a três molhos de couve (cada molho pesando cerca de 240 g e constituído de 6 folhas) foram embalados em sacos plásticos e armazenados nas condições de armazenamento descritas. Para compor o grupo controle uma amostra composta por 3 folhas foi retirada desses molhos, lavada em água corrente, seca, homogeneizada em processador tipo doméstico e analisada logo após a chegada ao laboratório.

Após 24 horas o restante das amostras foi lavado em água corrente e seco com papel toalha. As folhas foram sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15, 45 e 75 minutos. A solução sanitizante foi preparada conforme relatado no item 3.2.2.1. Em seguida as folhas foram enxaguadas em água corrente e secas com papel toalha. Um processador de vegetais tipo doméstico foi utilizado para homogeneizar as amostras antes da retirada das alíquotas para análise.

Na etapa 2, dois a três molhos de couve foram embalados e armazenados por 24 horas. Depois de transcorrido esse período as amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha, sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15 minutos, enxaguadas em água corrente, secas em papel toalha e fatiadas manualmente. Cada folha de couve foi cortada ao meio longitudinalmente, sendo uma das metades fatiada em tiras com cerca com 0,3 cm de largura e a outra metade rasgada. Em seguida, as amostras fatiadas foram refogadas em óleo de soja, sem adição de tempero, por 3 minutos, empregando um fogão a gás tipo doméstico. Foram utilizados 14 mL de óleo de soja para cada 100 g de couve e uma pequena porção de água foi adicionada durante o processo, apenas para evitar que as folhas se queimassem. As amostras de couve refogada foram acondicionadas em vasilhames de polietileno e permaneceram expostas, em temperatura ambiente, por 0, 30 e 60 minutos.

3.2.3. Determinação de sólidos

3.2.3.1. Sólidos solúveis totais

Foram determinados os teores de sólidos solúveis totais em tomate empregando-se refratômetro digital. A amostra foi macerada manualmente e cerca de duas gotas foram transferidas para o refratômetro. Os resultados foram expressos em graus Brix.

3.2.3.2. Sólidos totais

As porcentagens de sólidos totais em couve foram determinadas por diferença após determinação do teor de umidade das amostras conforme metodologia descrita por Kawashima e Valente Soares (2003). Cerca de 10 g de couve foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 105 °C por duas horas.

3.2.4. Extração

3.2.4.1. Ácido Ascórbico

A extração de ácido ascórbico foi realizada conforme metodologia previamente otimizada neste laboratório (dados ainda não publicados). A solução extratora foi composta por ácido metafosfórico 3 %, ácido acético 8%, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1 mM. O preparo de 100 mL de solução extratora foi realizado da seguinte forma:

- 3 g de AMP foram dissolvidos em pequena quantidade de água ultrapura (cerca de 10 mL);
- 0,0294 g de EDTA foram dissolvidos em pequena quantidade de água ultrapura (cerca de 10 mL);
- 8 mL de ácido acético foram adicionados a balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 30 mL de água ultrapura;
- O AMP e o EDTA dissolvidos foram adicionados ao balão volumétrico e os bequers em que estes foram dissolvidos foram enxaguados com água ultrapura e esta água adicionada ao balão;
- 0,8 mL de H₂SO₄ a 90% foram adicionados lentamente ao balão volumétrico;
- Por último completou-se o volume para 100 mL de solução.

O procedimento de extração foi realizado conforme descrição a seguir:

- Cerca de 5 g de tomate ou 3 g de couve foram pesados e triturados com 15 mL de solução extratora, por 5 minutos;
- Em seguida a amostra foi filtrada a vácuo, em papel de filtro;
- O papel de filtro foi lavado com cerca de 5 mL de água ultrapura;
- O filtrado foi diluído com água ultrapura até volume de 25 mL em balão volumétrico;
- O extrato foi então centrifugado por 15 minutos a 0,402 xg (4000 rpm);
- O sobrenadante foi separado e armazenado a 5 °C até a análise cromatográfica.

3.2.4.2. Carotenóides

O processo de extração dos carotenóides foi realizado segundo Rodriguez et al. (1976), com algumas modificações:

- Cerca de 5 g de tomate e 3 g de couve foram triturados com 60 mL de acetona resfriada;
- O material foi então filtrado a vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro. A extração com acetona foi repetida até o resíduo do filtro se tornar descolorido (cerca de 20 mL de acetona a mais foram gastos para este fim).
- Em seguida, o filtrado foi transferido, aos poucos, para um funil de separação, onde foram adicionados 50 mL de éter de petróleo resfriado.
- Lavou-se cada fração com água destilada três vezes, para retirar toda a acetona.

Para extração de β -caroteno da couve algumas alterações no processo de extração logo após a trituração foram necessárias. Para couve crua, antes da filtração e transferência para éter de petróleo, a amostra permaneceu por 20 minutos em banho ultrassônico, conforme proposto por de Sá & Rodriguez-Amaya (2004). As amostras de couve refogada permaneceram por duas horas no congelador depois de trituradas (para que ocorresse a solidificação do óleo) e em seguida foram filtradas em funil de vidro resfriado. Após esses procedimentos a extração seguiu como descrito anteriormente.

A concentração dos extratos de couve e tomate foi feita da seguinte maneira:

- Acrescentou-se sulfato de sódio anidro ao extrato etéreo para retirar qualquer resíduo de água que tivesse restado e que poderia prejudicar a evaporação do material;
- A evaporação do extrato em éter de petróleo foi feita em evaporador rotativo, na faixa de temperatura entre 35 e 37 °C;
- Os pigmentos foram, então, dissolvidos novamente em 25 mL de éter de petróleo e armazenados em frascos de vidro âmbar a -5 °C, até a análise dos carotenóides (cerca de 24 horas).

Destaca-se que em todas as análises as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial durante todo o processo, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo “blackout”.

3.2.5. Isolamento dos padrões de licopeno e β -caroteno

Os padrões de β -caroteno e licopeno foram isolados de extrato concentrado de cenoura e tomate, respectivamente, por cromatografia de coluna aberta, conforme descrição de Rodriguez-Amaya (1999).

Para separação de β -caroteno, cerca de 20 g de cenoura foram triturados com acetona resfriada (150 mL) e posteriormente transferidos para éter de petróleo (100 mL), conforme descrito no item 3.2.4.2. O extrato assim obtido foi concentrado em evaporador rotativo por 5 minutos. Para concentrar ainda mais o extrato sem estender o tempo de exposição ao calor foi empregado fluxo de nitrogênio, até obter um volume de cerca de 5 mL. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e celite (1:2) e a fase móvel foi composta por 2 % de éter etílico em éter de petróleo. Foi empregada coluna de vidro de cerca de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e recheio de cerca de 15 cm de altura. O extrato foi acrescentado ao topo da coluna vagarosamente. Após a penetração do extrato na fase estacionária adicionou-se a fase móvel aos poucos até a separação do β -caroteno.

Para obtenção do padrão de licopeno cerca de 20 g de tomate foram preparados conforme descrito anteriormente para cenoura. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e celite (1:1) e o recheio ativado por 4 horas a 110 °C. Foi empregada coluna de vidro de cerca de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e recheio de cerca de 20 cm de altura. Foram empregadas fases móveis com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (2 a 5 %) e concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (5 a 100 %) para separação dos carotenóides, da seguinte forma:

- Após a penetração do extrato de carotenóides na fase estacionária adicionou-se cerca de 50 mL de fase móvel (2% de éter etílico em éter de petróleo) e aguardou-se a sua passagem;
- Em seguida foi sendo adicionada, aos poucos, fase móvel 5% de éter etílico em éter de petróleo (50 mL);
- Após a passagem dessas fases adicionou-se ao topo da coluna outra fase móvel composta por 2% de acetona em éter de petróleo (50 mL);
- A concentração de acetona na fase móvel foi gradativamente aumentada até 20 %. Neste caso foram usados cerca de 20 mL para cada concentração intermediária (5, 10, 15 e 20 %);
- Continuou-se a elevar a proporção de acetona na fase móvel empregando entre 10 e 20 mL de fases móveis contendo 30, 40, 50, 60, 80 e por último 100 % de acetona;
- Retirou-se a fase estacionária da coluna de vidro;
- Para retirada total do licopeno da fase estacionária foi necessário empregar fase móvel contendo 5 % de água em acetona e em seguida uma solução de 10 % de água em acetona.
- A mistura foi então filtrada a vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro para separar a fase móvel (contendo os carotenóides) da fase estacionária.

Os padrões assim obtidos foram transferidos para frascos de vidro âmbar, secos sob fluxo de nitrogênio, lacrados e armazenados a -5 °C. A pureza das soluções foi verificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a quantificação foi realizada por espectrofotometria, baseando-se na absorvância máxima, segundo a lei de Lambert-Beer. Os coeficientes de absorvidade utilizados foram 2592 para β -caroteno e 3450 para licopeno. Os comprimentos de onda de máxima absorção foram β -caroteno: 450 nm e licopeno: 469 nm, em éter de petróleo (Rodríguez-Amaya, 1989).

A confirmação da identidade dos padrões foi feita baseada nos seguintes parâmetros:

- ordem de eluição das frações na coluna;
- coloração dos pigmentos eluídos;
- tempo de retenção em CLAE;
- espectros de absorção característicos.

3.2.6. Análise cromatográfica

Antes da análise cromatográfica as amostras e padrões foram filtrados em unidades filtrantes de 0,45 μ m de porosidade.

3.2.6.1. Curvas-padrão de ácido ascórbico, licopeno e β-caroteno

A solução padrão estoque de AA (1 mg/mL) foi preparada em água ultrapura e soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução extratora, cuja composição foi descrita no item 3.2.4.1.

Para construção da curva padrão de AA utilizou-se a injeção de volumes crescentes de uma solução padrão a 50 µg/mL. A concentração real da solução foi verificada por espectrofotometria e corrigida adequadamente. A equação e coeficientes usados para cálculo da concentração foram:

$C (\mu\text{g/ml}) = \text{ABS} \times 10^4 / E^{1\%}_{1\text{cm}}$, onde C é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 245 nm), em solução tampão fosfato pH 2,0 e $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ é o coeficiente de absorvidade molar (560) (Ball, 1994).

A solução tampão fosfato foi preparada da seguinte forma:

- 2,57 g de NaH_2PO_4 foram diluídos em água até volume final de 100 mL;
- Em seguida, 1,5 mL de H_3PO_4 foram diluídos em água até volume final de 100 mL;
- Misturaram-se partes iguais das duas soluções obtidas e o pH foi checado em pHmetro digital (pH 2,0).

As curvas-padrão de AA, β-caroteno e licopeno são apresentadas na Figura 1.

Para construção da curva padrão de β-caroteno foi feita a injeção de volumes crescentes de uma solução a 1,3 µg/ml. A curva-padrão de licopeno foi construída pela injeção de volumes crescentes de duas soluções padrão (2 µg/ml e 8 µg/ml). A concentração real dos padrões de carotenos foi determinada por espectrofotometria e adequadamente corrigida.

3.2.6.2. Análise de ácido ascórbico

Para análise de AA empregou-se a metodologia descrita por Franke et al (2004), com alterações. A fase móvel foi composta por: 1 mM NaH_2PO_4 (0,0120 g para cada 100 mL) e 1 mM EDTA (0,0294 g para cada 100 mL), pH ajustado para 3.0 com H_3PO_4 . O fluxo foi ajustado a 1 ml/min, em eluição isocrática. A detecção foi realizada a 245 nm. A separação foi feita em coluna Lichospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 µm (Merck, Alemanha).

A identificação do AA nas amostras foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos nas amostras com os obtidos para o padrão de AA analisados sob as mesmas condições, bem como a comparação dos espectros de absorção, empregando-se o detector de arranjos de diodos.

3.2.6.3. Análise de carotenóides

A análise baseou-se nas condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana et al. (1998), com algumas modificações. Foi utilizada coluna VP-ODS 150 mm x 4,6 mm, Shimadzu. A fase móvel foi composta por metanol, acetato de etila, acetonitrila (50:40:10). Eluição isocrática e fluxo ajustado em 1,0 mL/minuto. A detecção foi realizada a 450 nm.

Antes da injeção os pigmentos foram transferidos novamente para acetona. O procedimento é descrito a seguir:

- 2 mL de amostra foram pipetados em frasco âmbar e secos sob fluxo de nitrogênio;

- Foram adicionados 2 mL de acetona à amostra seca;
- Em seguida a amostra foi filtrada utilizando unidades filtrantes;
- Foram injetados 30 μL de amostra.

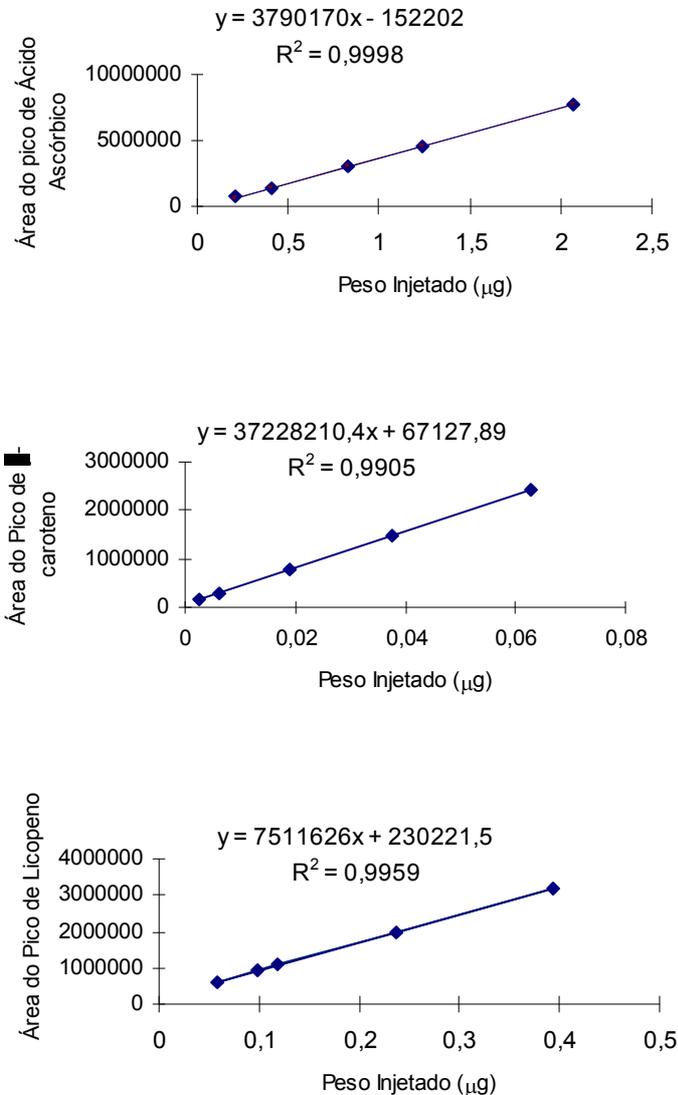


Figura 2. Curvas-padrão de ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno

3.2.6.4. Conversão de ácido desidroascórbico em ácido ascórbico

A conversão do DHA a AA foi realizada conforme metodologia previamente otimizada neste laboratório (dados ainda não publicados). A quantificação do DHA foi realizada por diferença do conteúdo de AA total (após a conversão do DHA a AA) e do conteúdo de AA (antes da conversão do DHA).

Para amostras de tomate e couve crua utilizou-se o seguinte procedimento:

- Foi pipetado 1 mL de amostra em um frasco âmbar;
- Em seguida foi adicionado 1,0 mL de solução tampão Trizma 0,5 M (pH 9,0) contendo 40 mM de DTT;

- A reação processou-se por 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
- Após os 10 minutos adicionou-se 0,5 mL de H₂SO₄ 0,4 M;
- Após filtração, injetou-se 30 µL das amostras.

A adição de tampão ao extrato elevou o pH para próximo à neutralidade. O H₂SO₄ foi adicionado às amostras para reduzir novamente o pH antes da injeção cromatográfica.

Embora a solução tampão Trizma contivesse 40mM de DTT, a concentração final de DTT durante a reação foi de 20 mM, uma vez que 40 mM (6,17 mg de DTT) foram diluídos em 2 mL de líquido (1 mL de tampão e 1 mL de amostra), reduzindo a concentração à metade.

Para as amostras de couve refogada foram utilizados 1,5 mL de tampão Trizma contendo 40 mM de DTT e 1 mL do extrato de couve refogada. O tempo e as condições de reação foram os mesmos usados para tomate e couve crua. Para reduzir novamente o pH antes da injeção foi necessário adicionar 1,5 mL de H₂SO₄, 0,4 M.

Em todos os casos a injeção cromatográfica foi feita imediatamente após a reação de conversão.

3.2.7. Testes de recuperação, linearidade e limite de detecção

Testes de recuperação de AA, licopeno e β-caroteno foram realizados pela adição de padrão às amostras de tomate, couve crua e couve refogada na proporção de cerca de 50 % do conteúdo médio original das amostras. As porcentagens de recuperação foram obtidas a partir da diferença percentual entre os teores iniciais analisados e os adicionados às amostras previamente homogeneizadas.

A determinação da faixa de linearidade foi feita pela injeção, em duplicata, de volumes crescentes das soluções padrão de AA, licopeno e β-caroteno, nas mesmas condições cromatográficas usadas para análise das amostras. Os dados obtidos para áreas dos picos na concentração usada para cada composto em estudo foram usados para análise de regressão linear. A avaliação da linearidade foi feita pelo coeficiente de determinação (R²).

O limite de detecção qualitativo foi determinado como a concentração em que a razão entre a altura do pico e o ruído da linha de base fosse 3 (Rodriguez-Amaya, 1999).

3.2.8. Cálculos

3.2.8.1. Retenção

As porcentagens de retenção de AA, DHA, vitamina C total, licopeno e β-caroteno foram calculadas de acordo com a equação: $100 - [(\text{conteúdo inicial} - \text{conteúdo final}) / \text{conteúdo inicial} \times 100]$, em que o conteúdo inicial corresponde à amostra controle e conteúdo final às amostras após os tratamentos em que a cocção não foi empregada.

Para que pudessem ser realizadas comparações entre as quantidades reais de vitamina C e carotenóides na couve crua e refogada, as porcentagens de retenção real de vitamina C e carotenóides foram calculadas de acordo com a técnica proposta por Murphy et al. (1975), utilizando a equação:

$$\%RR = \frac{C_p \times P_p}{C_c \times P_c} \times 100;$$

em que % RR é a porcentagem de retenção real, Cp conteúdo do nutriente por grama do alimento preparado, Pp peso do alimento (em gramas) após o preparo, Cc conteúdo do nutriente por grama do alimento cru e peso do alimento cru (em gramas).

3.2.8.2. Valor de vitamina A

O cálculo do valor de vitamina A foi feito segundo as recomendações do Institute of Medicine (IOM, 2001), em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) equivale a 1 µg de retinol ou 12 µg de β-caroteno.

Referências bibliográficas

- Ball, G. F. M. (1994). *Water-soluble vitamin assays in human nutrition*. London: Chapman & Hall.
- de Sá, M. C. & Rodriguez-Amaya, D. B. (2004). Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – Comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 37-51.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Arakaki, C., Murphy, S. P. (2004). Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 1–35.
- IOM - U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (2001). *Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington: National Academy Press.
- Kawashima, L. M., Valente Soares, L. M. (2003). Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 605–611.
- Murphy, E. W., Criner, P. E., Gray, B. C. (1975). Comparison of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 1153 –1157.
- Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Stringheta, P. C., Brandão, S. C. C., Azeredo, R. M. C. (1998). Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 61(1-2), 145-151.
- Rodriguez, D. B., Raymundo, L. C., Lee, T., Simpson, K. L., Chichester, C. O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annual Botanic*, 40, 615-624.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1989). Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis*, 5, 191-225.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1999). *A guide for carotenoids analysis in foods*. Washington: International Life Sciences Institute Press.
- SAS Institute Inc. (1994). *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc. 846p.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo 1:

Estabilidade de antioxidantes em hortaliças durante o armazenamento e o preparo: uma revisão

Resumo

Há um crescente interesse na relação entre a alimentação e a saúde, destacando-se o consumo de antioxidantes naturais em alimentos, como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e flavonóides. Com isso, aumenta também a importância da retenção desses compostos em alimentos, frente ao processamento. As hortaliças destacam-se como fontes importantes de antioxidantes e são o objeto dessa revisão. Foi dado enfoque a estudos que avaliaram a estabilidade de antioxidantes naturais em hortaliças durante o armazenamento, pré-preparo e preparo doméstico e em restaurantes. Além disso, são apresentados alguns trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante das hortaliças após sua manipulação.

Palavras-chave: vitamina C, vitamina E, flavonóides, carotenóides, manipulação, hortaliças.

1. Introdução

Os estudos envolvendo compostos antioxidantes naturalmente presentes em alimentos e a prevenção ou controle de doenças não transmissíveis, como câncer e arteriosclerose, têm chamado a atenção da comunidade científica e também da população em geral (Dwyer et al., 2003; Kenekt et al., 2002; Kris-Etherton et al., 2002; Michaud et al., 2000, Rao & Agarwal, 1999).

É interessante notar que o consumo de alimentos fontes desses compostos tem sido apontado como fator protetor para doenças (Hyson, 2002), enquanto o consumo de suplementos isolados ainda enfrenta problemas quanto à dosagem e eficácia. A explicação para isso seria o efeito sinérgico dos compostos antioxidantes, a presença de outros compostos bioativos e fibra alimentar nos alimentos (Trombino et al., 2004; Lee et al., 2003) e, possivelmente, a presença de outros fatores ainda não esclarecidos que potencializariam a ação antioxidante. Com isso, cresce o interesse pela ingestão de alimentos fonte de antioxidantes naturais.

Sabe-se que as hortaliças são fontes importantes de diversos compostos antioxidantes como vitamina C, flavonóides, vitamina E e carotenóides. Esta é uma das razões porque o consumo de frutas e hortaliças vem sendo continuamente incentivado (Center for Disease Control, 2006).

As hortaliças são, muitas vezes, consumidas na forma crua. Mas há situações em que a cocção é necessária ou ainda preferida. Neste caso, o conteúdo e a capacidade antioxidante desses vegetais podem ser alterados. Nicoli, Anese & Parpinel (1999) apontaram diferentes conseqüências da armazenagem e processamento sobre as propriedades antioxidantes de alimentos como a perda de antioxidantes naturalmente presentes, melhora da capacidade antioxidante de compostos naturalmente presentes, formação de novos compostos com atividade antioxidante ou pró-oxidante ou, ainda, nenhuma mudança na concentração de antioxidantes naturalmente presentes.

A característica antioxidante da vitamina C, da vitamina E, dos carotenóides e dos flavonóides é o que os torna susceptíveis à degradação por oxidação, que pode ser influenciada pela presença de oxigênio, luz, calor e íons metálicos (Davey et al., 2000; Britton, 1992).

Boa parte dos estudos a respeito da perda de antioxidantes em alimentos processados refere-se a alimentos industrializados (Chang, Lin, Chang & Liu, 2006; Toor & Savage, 2006; Giannakourou & Taoukis, 2003; Sánchez-Mata, Cámara & Díez-Marqués, 2003; Takeoka et al., 2001; Desobry, Netto & Labuza, 1998; Sotiriadis & Hoskins, 1982). Poucos são os estudos, até o momento, que avaliaram a estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças frente ao armazenamento e processamento doméstico ou mesmo em grande escala, em restaurantes (Moraes et al., 2005, Campos et al., 2003, Howard et al., 1999, Pinheiro Sant'Ana et al., 1998a, Pinheiro Sant'Ana et al., 1998b).

Somado a isso, existe o fato de que a comparação dos estudos existentes é dificultada por alguns fatores. O conteúdo inicial de antioxidantes em vegetais pode variar largamente em razão da variedade, condições de cultivo, clima e grau de maturação (Botelho & Mercadante, 2003; Lee & Kader, 2000; Bravo, 1998; Eintenmiller, 1997) e o teor inicial pode influenciar na retenção final, como já foi observado (Lisiewska & Kmiecik, 1996). As condições de armazenamento pós-colheita e os fatores envolvidos no processamento, como forma de fatiamento, tempo, temperatura e forma de cocção, também variam

amplamente entre os estudos e precisam ser relatados com clareza para permitir comparações.

Além disso, a comparação do conteúdo de antioxidantes da amostra fresca e da amostra processada deve levar em consideração as alterações de peso que podem ocorrer, como aumento de peso pela incorporação de óleo ou redução de peso pela perda de água. Muitos dos estudos realizados não levaram em consideração essas alterações e podem estar super ou subestimando a estabilidade dos antioxidantes.

Outro fator que dificulta a comparação dos resultados é a variedade de metodologias usadas para determinar o conteúdo dos compostos nos alimentos e principalmente para determinar a atividade antioxidante de dado alimento.

O objetivo deste trabalho é oferecer a estudantes e profissionais da área de alimentos um panorama atualizado da literatura que enfoca a estabilidade de vitaminas antioxidantes, carotenóides e fenólicos em hortaliças, durante seu armazenamento, pré-preparo e preparo.

2. Principais antioxidantes naturais em alimentos

2.1. Vitamina C

A vitamina C pode ser sintetizada por plantas e por quase todos os animais, com exceção dos humanos, primatas, alguns roedores e pássaros (Rios e Penteado, 2003), sendo, portanto, necessária sua obtenção através da alimentação para suprir as necessidades nutricionais diárias. Ela é amplamente encontrada em frutas e vegetais na forma de ácido ascórbico ou na forma oxidada, ácido desidroascórbico. Dentre as suas funções no organismo humano estão a participação na produção de colágeno, no metabolismo da tirosina, na biossíntese de carnitina, no metabolismo do colesterol e na absorção de ferro não-heme (Davey et al., 2000; Lee & Kader, 2000).

Além disso, a vitamina C age como seqüestrante de espécies reativas do oxigênio, formadas, em geral, durante o metabolismo normal das células. Devido à sua hidrossolubilidade a vitamina C atua como antioxidante em ambientes aquosos, mas tem ação limitada na prevenção da peroxidação lipídica em ambientes lipofílicos (Bianchi & Antunes, 1999). No entanto, a vitamina C está envolvida na regeneração do α -tocoferol oxidado (Davey et al., 2000).

2.2. Vitamina E

A vitamina E engloba um conjunto de compostos lipossolúveis que podem ser divididos em dois grupos principais, os tocoferóis e os tocotrienóis (Machlin, 1991). O Institute of Medicine, USA, revisou a atividade biológica desses compostos e concluiu que apenas o α -tocoferol pode ser atribuída atividade vitamínica (Trumbo et al., 2003). Entretanto esta decisão é polêmica e vem sendo contestada (Bieri, 2002; Jiang et al., 2001). Paralelamente, há evidências de que uma mistura de tocoferóis tem melhor ação antioxidante e anti-inflamatória que o α -tocoferol utilizado isoladamente (Saldeen & Saldeen, 2005).

Entre as hortaliças, os vegetais folhosos verde escuros são apontados como boas fontes de vitamina E (Piironen et al., 1986).

A mais bem estabelecida atividade da vitamina E no organismo humano é a sua ação antioxidante. O principal papel da vitamina E envolve a interrupção da peroxidação lipídica por meio da doação de hidrogênio aos radicais livres.

(Pinchuk & Lichtenberg, 2002). A característica lipofílica da vitamina E permite que ela atue nas membranas lipoprotéicas, quelando oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997).

2.3. Compostos fenólicos

Há várias classes de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Entre essas, os flavonóides formam o grupo de maior importância, com cerca de 4000 compostos identificados (Hollman, & Katan, 1999), que ainda podem ser subdivididos.

Os flavonóides podem ser encontrados amplamente em vegetais com grande variação em seu conteúdo total e distribuição qualitativa (Chu, Chang & Hsu, 2000).

Entre as possíveis ações dos flavonóides no organismo humano destacam-se a inibição da proliferação de células cancerígenas e efeitos antiinflamatórios e antiateroscleróticos (Birt, Hendrich & Wang, 2001; Nijveldt et al., 2001; Hollman, & Katan, 1999). Agem como seqüestrantes de ânions superóxido (Robak & Gryglewski, 1988) e outros compostos reativos, formando compostos menos reativos (Nijveldt et al., 2001).

2.4. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos que conferem cores, que vão do amarelo ao vermelho, em diversos alimentos. Eles podem ser divididos em dois grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos, cíclicos ou não, e as xantofilas, que são derivados oxigenados (Britton, 1992).

Alguns carotenóides, como α e β -caroteno e β -criptoxantina, podem ser convertidos a vitamina A após sua ingestão, exercendo papel importante nos processos de visão, diferenciação celular e imunidade (Olson, 1991).

As hortaliças folhosas verde escuras, seguidas das cenouras e abóboras, são as principais fontes alimentares de carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1997).

A estrutura altamente insaturada dos carotenóides torna-os bastante susceptíveis à isomerização e oxidação (Rodriguez-Amaya, 1997). Essa estrutura possibilita sua atuação como antioxidantes por meio da ação seqüestrante de espécies reativas do oxigênio, especialmente radicais peroxila e "oxigênio singlet" (1O_2) (Tapiero, Townsend, Tew, 2004).

Embora também sejam lipofílicos, os carotenóides, em geral, atuam em situações diferentes da vitamina E, influenciados pela tensão de oxigênio do meio (Ferreira & Matsubara, 1997).

3. Estabilidade

3.1. Armazenamento

As formas de armazenamento usadas para hortaliças incluem armazenamento em temperatura ambiente, refrigeração e congelamento. Nesta revisão incluíram-se pesquisas que investigaram a estabilidade de antioxidantes naturais em temperatura ambiente e de refrigeração.

O brócolis parece reter bem o conteúdo de ácido ascórbico quando armazenado em temperatura de refrigeração, mas não quando armazenado em temperaturas mais altas. De acordo com Vallejo, Tomas-Barberan, & Garcia-Vigueira (2003), o conteúdo de vitamina C em brócolis embalado reduziu cerca de 2 % após 7 dias de armazenamento a 1 °C, simulando o tempo de transporte e distribuição da hortaliça. Apesar de a perda ter sido pequena, houve oxidação de parte do ácido ascórbico com aumento de cerca de 170 %

no conteúdo de ácido desidroascórbico. Simulando o período de exposição para venda, foram acrescentados 3 dias ao tempo de armazenamento, mas neste caso a 15 °C e a perda de vitamina C passou para 13 %.

Em outro estudo, realizado na Polônia, o teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos e a atividade antioxidante de brócolis foram medidos após diferentes condições de armazenamento. Em brócolis armazenado sem embalagem houve elevação da concentração de ácido ascórbico durante o armazenamento a 5 °C por 7 dias, mas a 20 °C a elevação ocorreu no primeiro dia de armazenamento e em seguida houve queda de cerca de 26 % após 3 dias de armazenagem. Também ocorreu aumento dos teores de compostos fenólicos e da atividade antioxidante após o armazenamento a 20 °C por 3 dias. Os autores atribuem o aumento no teor de ácido ascórbico ao estresse sofrido durante a colheita e tratamento em baixas temperaturas. Cabe ressaltar, porém que os autores não consideraram a ocorrência de possíveis perdas de umidade com o armazenamento, já que o brócolis foi armazenado sem embalagem, o que elevaria a concentração de sólidos. Durante o armazenamento a 5 °C, também houve elevação dos teores de compostos fenólicos e da atividade antioxidante, mas esta elevação se deu mais lentamente, sendo necessário cerca de 7 dias de armazenamento (Leja et al., 2001). Ao contrário, grandes perdas (acima de 70 %) de compostos fenólicos foram observadas após o armazenamento de brócolis por 7 dias a 1 °C (Vallejo et al., 2003).

Cerca de 40 % da vitamina C no brócolis e 90 % no espinafre foram perdidas quando armazenados em temperatura de 20 °C por 3 dias, demonstrando a influência da matriz da hortaliça nos processos que levam à redução dos antioxidantes naturais. Já o armazenamento por 3 dias a 4 °C não resultou em perda de vitamina C em brócolis, mas no espinafre a perda foi de 40 % (Favel, 1998).

Chu, Chang, & Hsu (2000) relataram perda de 67 % do conteúdo de flavonóides em folhas de batata doce após armazenamento por 4 dias a temperatura ambiente (25 °C), enquanto após armazenamento em temperatura de refrigeração (4 °C) a perda foi de 20 %, aumentando para 55 % após 9 dias de armazenamento. Os autores concluíram ainda que a atividade antioxidante, medida por meio da atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), superóxidos e radicais hidroxilas, o poder de redução e inibição da oxidação de ácido linoléico, foi melhor preservada nas folhas armazenadas em temperatura de refrigeração.

Apesar da limitação no número de trabalhos, observa-se que o armazenamento sob refrigeração preserva melhor o teor de antioxidantes naturais em hortaliças.

3.2. *Pré-preparo*

As operações de pré-preparo de hortaliças incluem, principalmente a higienização e fatiamento. O fatiamento, em especial, provoca desarranjo da estrutura do tecido vegetal, expondo os antioxidantes naturais à ação de enzimas presentes no vegetal, as quais podem degradar os antioxidantes, além da maior exposição às condições como luz, calor e oxigênio (Combs, 1998). Pouco tem sido pesquisado a respeito da estabilidade de antioxidantes neste processo.

Barry-Ryan & O'Beirne (1999) relataram diferenças na retenção de vitamina C em alface de acordo com o método de fatiamento usado. Houve menor perda de vitamina C em alface rasgada do que em alface fatiada com faca após 24

horas de armazenamento (amostras embaladas e armazenadas a 8 °C). Utilizando uma máquina de fatiar a perda foi 25 % maior e quando se empregou uma lâmina “cega” as perdas foram ainda maiores.

Em restaurante comercial as perdas acumuladas de ácido ascórbico durante as etapas de pré-preparo (higienização e fatiamento) foram de cerca de 42 % em alface, 40 % em chicória, 13 % em couve, 17 % em cenoura, 14 % em couve-flor, 17 % em repolho e 18 % em tomate (Moraes et al., 2005). Os autores sugerem que as perdas mais relevantes em folhas como alface e chicória podem estar relacionadas a estrutura mais delicada e sensível dessas folhas.

Lana & Tijssens (2005) relataram perda na capacidade seqüestrante de radicais em extratos hidrofílicos de tomate após o fatiamento e armazenamento por 10 dias a 5 °C, em relação ao tomate mantido intacto pelo mesmo período e na mesma temperatura.

3.3. *Preparo*

O preparo inclui principalmente o processo de cocção, embora no caso de muitas hortaliças servidas cruas, refira-se à finalização da preparação com a mistura de ingredientes. Alguns trabalhos analisaram a estabilidade de antioxidantes em hortaliças, durante o tempo de espera entre o preparo e o consumo. Esses trabalhos foram incluídos nesta seção.

A cocção de hortaliças pode ser feita de diversas maneiras e em tempos diferenciados, em água em ebulição, a vapor ou calor seco, variando o tipo de equipamento empregado, como por exemplo, fogão convencional e forno de microondas. Embora o branqueamento não represente, a rigor, cocção das hortaliças, foram incluídos nesta revisão trabalhos que avaliaram a estabilidade de antioxidantes frente ao branqueamento, por ser este processo semelhante ao processo de cocção, exceto em relação ao tempo de exposição ao calor.

Ainda há divergência na literatura a respeito dos efeitos do cozimento sobre o teor de antioxidantes e atividade antioxidante em hortaliças. Quanto ao conteúdo de carotenóides, por exemplo, alguns trabalhos mostram que o cozimento pode causar perda (Gayathri et al., 2004; Campos et al., 2003), enquanto outros estudos encontraram resultados opostos, em que as perdas foram inexistentes ou houve aumento da concentração de carotenóides, mesmo após a correção de peso (Granado et al., 1992; Hart & Scott, 1995). Esse aumento no teor de carotenóides pode ser atribuído a uma maior facilidade de extração, porque o tratamento térmico inativa enzimas oxidativas e desnatura complexos carotenóide-proteína existentes nas células vegetais (Rodriguez-Amaya, 1997).

Analisando o conteúdo de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico Lisiewska & Kmiecik (1996) relataram redução do conteúdo de vitamina C total entre 41 e 42 % em brócolis e 28 a 32 % em couve-flor, após o branqueamento. Os autores não relataram qual o tempo de branqueamento empregado.

Howard et al. (1999) não encontraram influência da cocção em forno de microondas no teor de ácido ascórbico de brócolis e cenoura, após refrigeração. Já o branqueamento realizado com vapor reduziu em cerca de 30% o conteúdo de ácido ascórbico de brócolis. Em vagem a cocção por 7 minutos em microondas resultou em aumento de cerca de 15 % do ácido ascórbico e perda de 15 % de β -caroteno. Os autores também observaram aumento da retenção de β -caroteno em brócolis com a cocção em forno

microondas, no entanto correções quanto às alterações de peso ocorridas não foram relatadas.

O branqueamento de folhas de batata doce em água fervente por 30 segundos levou a perdas de cerca de 27 % do total de flavonóides presentes nas folhas cruas. Após 60 segundos, o branqueamento reduziu à metade o conteúdo de flavonóides, entretanto, após 120 segundos, as perdas permaneceram na ordem de 50 % (Chu, Chang, & Hsu, 2000).

A exposição ao calor também influenciou a concentração de fenólicos em hortaliças folhosas estudadas na Malásia. Após 1 minuto de cocção em água fervente, houve perda significativa de compostos fenólicos, como, de cerca de 12 % em couve, 14 % em espinafre e 20 % em repolho (Ismail, Marjan & Foong, 2004). No mesmo estudo a atividade antioxidante da couve e do espinafre reduziu cerca de 9 % e 7 %, respectivamente, após a cocção, enquanto para o repolho a redução não foi significativa. Turkmen, Sari & Velioglu (2005) também relataram redução no conteúdo de fenólicos em abóbora e alho-poró cozidos em água, no vapor e em forno de microondas. No entanto, houve elevação do conteúdo de fenólicos em brócolis após a cocção no vapor e microondas.

Seybold et al. (2004) não encontraram perdas de vitamina E em tomates assados por 15 e 30 minutos a 180, 200 e 220 °C, ao contrário, os autores relataram maiores concentrações de tocoferol no tomate assado do que no cru, mesmo quando a comparação foi feita em base seca. Estudando brócolis e pimentão vermelho, Bernhardt & Schlich (2006) relataram não haver diferença significativa entre as alterações no conteúdo de α -tocoferol e β -caroteno ocorridas durante a cocção em água, vapor, vapor sob pressão e microondas. Após a cocção houve aumento do conteúdo de α -tocoferol e β -caroteno em brócolis fresco, ocorrendo o inverso nos pimentões. Embora não tenha estudado a estabilidade da vitamina E, Guinazi (2004) observou aumento da concentração de vitamina E em couve e almeirão refogados, em relação às hortaliças cruas, por causa da adição de óleo de soja à preparação.

As perdas de β -caroteno em abóbora foram bem maiores do que em cenoura, ambas cozidas em água por 10 minutos (Gayathri et al., 2004). As perdas médias foram de 27 % em cenoura cozida sob pressão e 16 % sem pressão; em abóbora as perdas foram de 71 % quando aplicada pressão e 49 % sem pressão.

Almeida-Muradian, Vanderlinde & Sasaki (2000) relataram perdas de β -caroteno em folhas preparadas por cocção em água fervente por 10 minutos ou por 7 minutos em forno de microondas. As perdas de β -caroteno foram de 21 e 20 % em serralha e 11 e 26 % em aipo cozidos convencionalmente e em microondas, respectivamente. Em folhas de hortelã foi encontrado um padrão diferente, em que a retenção de β -caroteno foi de 100 % ou mais nas duas formas de cocção.

Considerando as alterações de peso ocorridas durante a cocção em restaurantes, as perdas de β -caroteno foram de cerca de 10 % em brócolis cozido (5 minutos em água fervente) e endívia refogada (4 minutos) (de Sá & Rodriguez-Amaya, 2004). Em outro trabalho, utilizando método de cocção e tempo semelhantes ao anterior, maior porcentagem de perda, média de 24 %, foi encontrada em brócolis cozido (Campos et al., 2003).

Para couve refogada (4 minutos) a perda média de β -caroteno foi de 95 %. Perdas pequenas também foram observadas para luteína tanto na couve quanto no brócolis e endívia. Já em brócolis refogado (4 minutos) e vagem refogada (10 minutos) houve retenção acima de 100 %. Os autores atribuem

isso à dificuldade de avaliar a retenção de carotenóides em certos alimentos cozidos (de Sá & Rodriguez-Amaya, 2004).

Speek, Speek-Saichua & Schreurs (1988) relataram perdas de 50 % do conteúdo de β -caroteno de repolho após cocção (4 minutos) e 43 % ao refogar-se o repolho (4 minutos).

Em tomates fritos em óleo de soja por 1 ou 2 minutos, as perdas de β -caroteno foram de 5 a 27 % (Kidmose et al., 2006).

A cocção de duas variedades de tomate por diferentes métodos resultou em perdas diferentes em relação à variedade e ao método de cocção (Sahlin, Savage & Lister, 2004). Na variedade "Aranca" as perdas de ácido ascórbico, licopeno e fenólicos totais foram menores no tomate assado por 18 minutos a 200 °C, enquanto na variedade "Excell" as menores perdas ocorreram em tomates cozidos por 15 minutos a 100 °C. Nas duas variedades o processo de fritar a 110 °C por 4 minutos levou às maiores perdas, enquanto a atividade antioxidante não sofreu interferência da cocção. Nesse mesmo estudo, foi investigada a estabilidade dos antioxidantes (ácido ascórbico, compostos fenólicos e licopeno) em tomates crus fatiados, marinados em azeite puro, vinagre puro e mistura de azeite e vinagre por 20 minutos. Os autores relataram que, em geral, o conteúdo de antioxidantes e a atividade antioxidante reduziram-se quando o tomate foi marinado, sendo a redução maior quando se utilizou a mistura azeite e vinagre.

Além da ampla variação na perda de compostos antioxidantes e de atividade antioxidante entre as espécies vegetais, há também diferenças quando se consideram partes diferentes de um mesmo vegetal. Zhang & Hamazu (2004) relataram maiores perdas de fenólicos nas flores do brócolis do que no caule, cozidos em água fervente (cozimento convencional), ocorrendo o inverso para ácido ascórbico e carotenóides. Quanto à perda de atividade antioxidante total, não houve grandes diferenças entre flores e caule cozidos. No mesmo estudo foram investigados a influência do tempo de cocção (30, 60, 90, 120 e 300 segundos) e do tipo de cocção (convencional e microondas). A cocção em forno de microondas afetou de maneira semelhante à cocção convencional o conteúdo de ácido ascórbico, carotenóides, fenólicos e a atividade antioxidante em brócolis. As perdas de compostos antioxidantes cresceram com o aumento do tempo de cocção. Em flores de brócolis, a cocção convencional por 30 segundos gerou perda de 32 % de fenólicos, 19 % de ácido ascórbico, 3 % de carotenóides e 19 % da atividade antioxidante. Aumentando o tempo de cocção para 300 segundos as perdas de compostos fenólicos foram de 77 %, ácido ascórbico 66 %, carotenóides 23 % e atividade antioxidante 65 %.

Testando a influência de diferentes formas de cocção de brócolis na sua atividade antioxidante, Chun-Hsien & Chi-Yue (2005) relataram aumento da atividade antioxidante, medida pelo poder de redução, em amostras pré-cozidas por 10 minutos a 50 °C e cozidas por 8 minutos em água fervente, em relação às amostras frescas. Os autores atribuíram estes resultados à danificação do tecido vegetal e maior exposição dos compostos antioxidantes com o aquecimento. Neste mesmo estudo, a atividade antioxidante medida de outras formas (poder quelante de íons ferrosos, atividade sequestrante de DPPH e atividade anti-peroxidante), em geral, reduziu-se após o tratamento térmico, em relação ao brócolis fresco.

Turkmen et al. (2005) também relataram aumento da atividade antioxidante de brócolis e espinafre e nenhuma alteração em alho-poró e abóbora submetidos a três métodos de cocção diferentes (água fervente, vapor e

microondas). Para explicar esse fenômeno, os autores sugerem a inativação de peroxidases cuja atividade seria pró-oxidante, a formação de novos compostos antioxidantes ou a melhora da capacidade antioxidante de compostos naturalmente presentes.

Em hortaliças preparadas em grandes quantidades, em restaurantes, as perdas de antioxidantes podem ser diferentes das perdas que ocorrem no processamento doméstico porque o volume preparado, em geral, eleva o tempo gasto durante o pré-preparo e preparo. Pinheiro-Sant'Ana et al. (1998b) concluíram que a cocção em água sem pressão foi o melhor método de cocção para cenouras preparadas em grande escala, quanto às perdas de β -caroteno, que foram em torno de 11 %, enquanto na cocção sob pressão as perdas foram de 20 %. A nível doméstico a cocção em água sem pressão também se mostrou como o melhor método na prevenção de perdas de β -caroteno em cenouras cozidas (Pinheiro-Sant'Ana et al., 1998a).

Rodrigues (2005) analisou as perdas de ácido ascórbico em sete hortaliças preparadas em dois restaurantes e encontrou ampla variação entre as espécies. As hortaliças folhosas eram armazenadas por cerca de 3 horas em temperatura ambiente, mais 15 a 24 horas a 15 °C, depois higienizadas, fatiadas e armazenadas por cerca de 2 horas em temperatura ambiente em um dos restaurantes e a 10 °C em outro. As perdas médias de ácido ascórbico foram 56 % em alface, 70 % em chicória, 31 % em repolho e 29 % em couve. Neste mesmo estudo, as perdas de ácido ascórbico foram de 27 % em cenoura cozida, 34 % em cenoura ralada crua, 47 % em couve-flor cozida e 27 % em tomate, armazenados a 10 °C por 3 a 7 dias ou em temperatura ambiente por 4 dias, higienizados, fatiados, cozidos (cenoura e couve-flor) e armazenados entre 5 e 8 °C ou 20 e 27 °C, por 3 horas até o consumo.

Pouca atenção tem sido dada às perdas ocorridas durante o tempo entre o preparo e o consumo. Estas perdas podem ser elevadas em restaurantes, onde o tempo de espera costuma ser alto (maior que 2 horas) e as temperaturas mais elevadas. Moraes et al. (2005) encontraram perdas que vão de 7 a 16 % em alface, chicória, couve, cenoura crua e cozida, couve-flor cozida, repolho e tomate. Para a maioria das hortaliças as perdas foram maiores quando estas foram mantidas em temperaturas entre 20 e 27 °C do que em temperaturas entre 5 e 8 °C após o preparo.

4. Conclusões

Boa parte dos estudos refere-se à vitamina C e β -caroteno, com poucos estudos realizados quanto à estabilidade de compostos fenólicos e total escassez em relação à vitamina E.

Embora haja resultados controversos, em geral, temperaturas de armazenamento mais baixas parecem reduzir as perdas de antioxidantes em alimentos. As operações de pré-preparo, embora pouco estudadas isoladamente, podem por si só levar a perdas consideráveis de antioxidantes naturais em hortaliças.

Em relação à cocção, os resultados foram ainda mais controversos, especialmente se for considerada a falta de padronização quanto à forma de cálculo da estabilidade e correção para alterações de peso.

A avaliação das alterações ocorridas na capacidade antioxidante das hortaliças frente ao processamento parece ser o fator mais complicado dada a complexidade desta propriedade e ampla variação entre os métodos de

análise. A relação entre atividade antioxidante e conteúdo de antioxidantes naturais após o preparo das hortaliças precisa ser melhor investigada.

A capacidade antioxidante e o conteúdo de antioxidantes naturais das hortaliças são influenciados pelo tratamento que estas recebem desde o seu armazenamento até seu consumo. Isto deve ser levado em consideração ao se calcular a ingestão de antioxidantes.

Vale ressaltar que, no Brasil há uma ampla variedade de hortaliças consideradas “regionais” que precisam ser pesquisadas quanto ao seu conteúdo de antioxidantes naturais e capacidade antioxidante.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- Almeida Muradian, L. B., Vanderlinde, D. W., Sasaki, R. (2000). Provitamin A activity of raw and cooked Brazilian leaves. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(2), 151-153.
- Barry-Ryan, C. & O'Beirne, D. (1999). Ascorbic acid retention in shredded iceberg lettuce as affected by minimal processing. *Journal of Food Science*, 64(3), 498-500.
- Bernhardt, S. & Schlich, E. (2006). Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering*, 77, 327–333.
- Bianchi, M. L. P. & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12(2), 123-130.
- Bieri, J. G. (2002). Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), 781.
- Birt, D. F., Hendrich, S.; Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157– 177.
- Botelho, R. B. A. & Mercante, A. Z. (2003). Influência de cultivar/variedade e efeitos geográficos na composição de carotenóides em alimentos – uma revisão. *Boletim SBCTA*, 37, 29-34.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*, 56, 317–33.
- Britton, G. Carotenoids. (1992). In Hendry, G. F. (Ed.), *Natural foods colorants (pp.141-148)*, New York: Blackie.
- Campos, F. M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Stringheta, P. C., Chaves, J. B. P. (2003). Teores de beta caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 163-169.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. (2006). *5 a Day Program*. Disponível em <http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/5aday/index.htm>. Acesso em 10/05/2006.
- Chang, C-H., Lin, H-Y., Chang, C-Y. & Liu, Y-C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478-485.
- Chu, Y-H, Chang, C-L, Hsu, H-F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.
- Chun-Hsien, L., & Chi-Yue, C. (2005). Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry*, 90, 9–15.
- Combs, G. F. Jr. (1998). *The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health* 2th ed. New York: Academic Press.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. J. J., Favell, D., & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- de Sá, M. C. & Rodriguez-Amaya, D. B. (2004). Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – Comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17:37-51.
- Desobry, S. A., Netto, F. M. & Labuza, T. P. (1998). Preservation of β -carotene from carrots. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 381-396.

- Dwyer, J.H.; Navab, M.; Dwyer, K.M.; Hassan, K.; Sun, P.; Shircore, A.; Hama-Levy, S.; Hough, G.; Wang, M.; Drake, T.; Merz, C.N.B.; & Fogelman, A.M. (2003). Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis Study. *Circulation*, 103: 2922-2927.
- Eintenmiller, R. R. (1997). Vitamin E content of fats and oils - nutritional implications. *Food Technology*, 51(5), 78-81.
- Favel, D. J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62(1), 59-64.
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-68.
- Gayathri, G. N., Platel, K., Prakash, J., & Srinivasan, K. (2004). Influence of antioxidant spices on the retention of β -carotene in vegetables during domestic cooking processes. *Food Chemistry*, 84, 35-43.
- Giannakourou, M. C., & Taoukis, P. S. (2003). Kinetic modeling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food Chemistry*, 83, 33-41.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. & Rojas-Hidalgo, E. (1992). Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 2135-2140.
- Guinazi, M. (2004). Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais. Viçosa, 2005. 90p. [Tese de Mestrado em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa].
- Hart, D. J. & Scott, K. J. (1995) 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 Chemistry*, 54, 101-111.
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 937-942.
- Howard, L. A., Wong, A. D., Perry, A. K., & Klein, B. P. (1999). β -carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science*, 64(5), 929-936.
- Hyson, D. (2002). *The health benefits of fruits and vegetables: a scientific overview for health professionals*. Produce for Better Health Foundation. 23p.
- Ismail, A., Marjan, Z. M, & Foong, C. H. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87, 581-586.
- Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K. & Ames, B. N. (2001). γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 714-22.
- Kenekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568.
- Kidmose, U, Yang R-Y, Thilsted, T. H., Christensen, L. P. & Brandt, K. (2006). Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 562-571.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9B), 71S-88S.

- Lana, M. M., & Tijskens, L. M. M (2006). Effects of cutting and maturity on antioxidant activity of fresh-cut tomatoes. *Food Chemistry*, 97(2), 203-211.
- Lee, K. W.; Lee, H. J.; Surh, Y-J.; Lee, C. Y. (2003). Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 1074-1078.
- Lee, S. K.; Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Leja, M., Mareczek, A., Starzynska, A., & Rozek, S. (2001). Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry*, 72, 219-222.
- Lisiewska, Z. & Kmiecik, W. (1996). Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention. *Food Chemistry*, 57(2), 261-270.
- Machlin, L. J. (1991). Vitamin E. In Machlin, L. J. (Ed.), *Handbook of vitamins* 2th ed. (pp.99-144). New York: Marcel Dekker.
- Michaud, D.S.; Feskanich, D.; Rimm, E.B.; Colditz, G.A.; Speizer, F.E.; Willett, W.C.; Giovannucci, E. (2000). Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 990-997.
- Moraes, F. A., Cota A. M., Pinheiro-Sant'Ana H. M., Campos, F. M, Rodrigues, C. M. A. (2005). Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (submetido).
- Nicoli, M. C.; Anese, M.; & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 94-100.
- Nijveldt, R. J.; Nood, E.; Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; Norren, K., & Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- Olson, J. A. (1991). In Machlin, L. J., (Ed.), *Handbook of Vitamins* 2th ed (pp. 1-57). New York: Marcel Dekker.
- Piironen, V.; Syväoja, E.-L.; Varo, P.; Salminen, K.; Koivistoinen, P. (1986). Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 742-746.
- Pinchuk, I.; Lichtenberg, D. (2002). The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progress in Lipid Research*, 41, 279-314.
- Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Stringheta, P. C., Brandão, S. C. C., Páez, H. H., Queiróz, V. M. V. (1998a). Evaluation of total carotenoids, α - and β -carotene in carrots (*daucus carota* L.) during home processing. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(1), 39-44.
- Pinheiro-Sant'Ana, H. M.; Stringheta, P. C.; Brandão, S. C. C.; Azeredo, R. M. C. (1998b). Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 61(1-2), 145-151.
- Rao, A. V.; Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research*, 19(2): 305-323.
- Rios, M. D. G.; & Penteadó, M. V. C. (2003). Vitamina C. In Penteadó, M. V. C. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos* (pp. 201-225). São Paulo: Manole.

- Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochemical Pharmacology*, 37, 83–88.
- Rodrigues, C. M. A. *Avaliação e controle de perdas de vitamina C em hortaliças preparadas em restaurante comercial e institucional*. Viçosa, 2005. 99p. [Tese de Mestrado em Ciência da Nutrição, Federal de Viçosa].
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1997) *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Washington: OMNI.
- Sahlin, E., Savage, G. P., Lister, C. E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 635-647.
- Saldeen, K. & Saldeen, T. (2005). Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25, 877–889.
- Sánchez-mata, M. C., Cámara, M., & Díez-Marqués, C. (2003). Extending shelf-life and nutritive value of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), by controlled atmosphere storage: micronutrients. *Food Chemistry*, 80, 317-322.
- Seybold, C., Fröhlich, K., Bitsch, R., Otto, K., & Böhm, V. (2004). Changes in contents of carotenoids and vitamin e during tomato processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7005-7010.
- Sotiriadis, P. K. & Hoskins, F. H. (1982). Vitamin retention during storage of processed foods. I. Effect of ascorbic acid on folates in cowpeas, okra and tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 16(2), 125-130.
- Speek, A. J.; Speek-Saichua, S.; Schreurs, W. H. P. (1988). Total carotenoid and β -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chemistry*, 27:245-257.
- Takeoka, G. R., Dao, L. Flessa, S. Gillespie, D. M., Jewell, W. T., Huebner, B., Bertow, D. & Ebeler, S. E. (2001). Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3713-3717.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 100–110.
- Toor, R. K. & Savage, G. P. (2006). Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry*, 94, 90–97.
- Trombino, S., Serini, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Ando, S., Picci, N., Caviello, G., & Palozza, P. (2004). Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: Synergistic interactions with β -tocopherol, β -carotene, and ascorbic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 2411-2420.
- Trumbo, P. R.; Yates, A. A.; Schlicker-Remfro, S.; Sutor, C. (2003). Dietary Reference Intakes: revised nutritional equivalents for folate, vitamin E and provitamin A carotenoids. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 379-382.
- Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93, 713–718.
- Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., & Garcia-Vigueira, C. (2003). Health promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3029-3034.

Zhang, D., & Hamauzu, H. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88, 503–509.

4.2. Artigo 2

***Otimização de metodologia para análise de ácido
ascórbico e ácido desidroascórbico em
hortaliças***

Resumo

A complexidade da composição química das hortaliças torna difícil a análise de vitamina C nesses vegetais. Neste trabalho, diferentes soluções para extração da vitamina C foram testadas. A cromatografia líquida de alta eficiência foi o método escolhido e as condições cromatográficas basearam-se em eluição isocrática, separação em coluna de fase reversa e detecção na faixa UV. A determinação do ácido desidroascórbico foi feita indiretamente, após a sua redução utilizando ditioneitol (DTT). O emprego de ácido metafosfórico (AMP) para estabilizar o ácido ascórbico mostrou-se necessário, embora sua concentração tenha sido reduzida, para evitar interferências na análise. Para aplicar o DTT em extratos acidificados foi necessário neutralizar o pH do extrato. Em amostras de couve e tomate a recuperação média foi de 90%. A presença de óleo não interferiu na extração do ácido ascórbico e a metodologia otimizada pode ser empregada também para análise de vitamina C em hortaliças refogadas.

Palavras-chave: vitamina C, extração, análise, cromatografia, tomate, couve.

1. Introdução

Entre as vitaminas hidrossolúveis a vitamina C é a que recebeu mais atenção dos pesquisadores nos últimos anos, principalmente por causa da sua ação antioxidante. A vitamina C é necessária para produção do colágeno, é essencial para a oxidação da fenilalanina e da tirosina e para a conversão de folacina em ácido tetra-hidrofólico, além de estar envolvida no processo de reação inflamatória (Mahan & Escott-Stump, 2005; Ball, 1994). Além disso, é conhecida a importância da vitamina C na biodisponibilidade do ferro dietético não-hemínico, aumentando sua absorção quando consumido numa mesma refeição (Cardoso & Penteado, 1994).

A principal forma ativa da vitamina é o ácido ascórbico (AA), mas sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico (DHA), também exibe função biológica, uma vez que pode ser facilmente reduzido a AA, no organismo humano (Lee & Kader, 2000). No entanto, os humanos não são capazes de sintetizar AA, que necessita ser fornecido pela alimentação (Ball, 1994). Hortaliças e frutas são conhecidamente as melhores fontes de vitamina C, sendo importante determinar seu conteúdo de AA e DHA. A obtenção de dados confiáveis a respeito do teor de vitamina C em hortaliças torna-se importante frente aos estudos epidemiológicos que relacionam a ingestão de vegetais e a prevenção de doenças.

A análise de vitamina C em alimentos exige alguns cuidados, que podem variar dependendo da matriz vegetal em estudo. O rompimento da estrutura celular durante os processos de extração permite que enzimas responsáveis pela degradação do AA entrem em contato com seu substrato. Pode ser necessário, portanto, impedir a ação enzimática por meio da redução do pH, o que favorece a estabilidade do AA. Além disso, a presença de metais como ferro e cobre aumentam a oxidação do AA (Ball, 1994) e um agente quelante de metais costuma ser recomendado (Hernández, Lobo & González, 2006).

Para extração de AA de tecidos vegetais, água pura (Gökmen, Kahraman, Ddemir, & Acar, 2000) ou soluções ácidas têm sido empregadas. Entre os ácidos comumente utilizados estão ácido metafosfórico (AMP) (Frenich Garrido, Hernández Torres, Belmonte Vega, Martínez Vidal, & Plaza Bolaños, 2005; Franke, Custer, Arakaki, & Murphy, 2004; Giannakourou & Taoukis, 2003) e ácido oxálico (Hernández et al., 2006; Tudela, Espín, & Gil, 2002; Kabasakalis, Siopidou, & Moshatou, 2000), sozinhos ou em combinações com outros ácidos e/ou solventes orgânicos, acrescidos ou não de antioxidantes como EDTA e BHT.

Diferentes métodos de análise de vitamina C em alimentos têm sido relatados. O método clássico é o titulométrico, que não quantifica DHA, apenas AA (AOAC, 1990). A espectrofotometria (Lisiewska & Kmiecik, 1996), fluorimetria (Kall & Andersen, 1999), amperometria (O'Connell, Gormally, Pravda, & Guilbault, 2001), eletroforese (Versari, Mattioli, Parpinello, & Galassi, 2004; Herrero-Martínez, Simó-Alfonso, Deltoro, Calatayud, & Ramis-Ramos, 1998) e cromatografia (Frenich Garrido, Hernández Torres, Belmonte Vega, Martínez Vidal, & Plaza Bolaños, 2005; Franke et al., 2004; Giannakourou et al., 2003; Furusawa, 2001) também têm sido usadas. No entanto, alguns desses métodos têm limitações quanto à especificidade. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) destaca-se como um método bastante confiável e, em geral, simples. Após a separação em coluna cromatográfica, a utilização de detector de arranjos de diodo pode melhorar a confiabilidade na identificação do AA (Furusawa, 2001). Como a detecção do DHA é dificultada

por sua fraca absorvidade molar (Ball, 1994), a maioria dos pesquisadores opta por reduzi-lo a AA antes da separação cromatográfica, realizando a quantificação indireta por diferença. Entre os agentes redutores o ditioneitol (DTT) tem sido amplamente utilizado (Silva, 2005; Furusawa, 2001; Gökmen et al., 2000; Sánchez-Mata, Cámara, & Díez-Marqués, 2003).

O objetivo deste estudo foi testar uma metodologia para análise de AA e DHA em hortaliças por cromatografia líquida de fase reversa, otimizando os processos de extração do ácido ascórbico e de conversão do ácido desidroascórbico a ácido ascórbico, empregando ditioneitol (DTT). Além disso, verificar a eficiência da metodologia otimizada na análise de hortaliças adicionadas de óleo.

2. Metodologia

2.1. Matéria-prima e preparação das amostras

As hortaliças escolhidas para este estudo foram couve (*Brassica oleracea*, var. acephala), cultivar Manteiga, e tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedade Santa Cruz, uma vez que são amplamente consumidas no Brasil e por diferirem bastante em sua estrutura, permitindo avaliar a eficiência do método de extração e análise para dois tipos distintos de vegetais.

As hortaliças foram adquiridas no mercado local, em grau de desenvolvimento adequado: tomates em estágio aparente de maturação fisiológica, de coloração vermelha uniforme; folhas de couve maduras, de tamanho padrão comercial.

Os tomates e as folhas de couve foram lavados em água corrente e secos em papel toalha. Em seguida foram picados em pedaços pequenos para facilitar a amostragem e a trituração.

Para testar a aplicação do método em hortaliças refogadas e a interferência do óleo, foi realizado o seguinte experimento: folhas de couve foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha e divididas ao meio. Uma das metades foi picada e realizada extração de vitamina C. À outra metade foi adicionado óleo de soja, na proporção de 7 g de óleo para 50 g de couve. Em seguida a amostra com óleo foi submetida ao processo de extração.

2.2. Reagentes e outros materiais

Foram utilizados: água ultrapura, produzida em sistema Milli-Q (Millipore, USA), ácido metafosfórico (p.a.) adquirido da Merck (Alemanha), ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Alemanha), ácido sulfúrico (H₂SO₄) (p.a.) (Mallinckrodt, USA), padrão ácido L-ascórbico e ácido acético (grau HPLC) da Vetec (Brasil).

A filtração das amostras foi realizada em papel de filtro, Quanta (Brasil) e antes da injeção as amostras e soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 µm de porosidade (Millipore, Brasil).

2.3. Extração da vitamina C

Os métodos de extração da vitamina C foram testados utilizando-se as seguintes soluções extratoras: (a) apenas água, como proposto por Gökmen et al. (2000), com algumas modificações, (b) ácido metafosfórico (AMP) 4,5 %, segundo o método proposto por Giannakourou et al. (2003), também com algumas modificações e (c) solução extratora composta por 3 % AMP, 8 % ácido acético, 1 mM EDTA e 0,3 N H₂SO₄.

Os processos de extração seguiram a seguinte seqüência, sendo alteradas apenas as soluções extratoras: as hortaliças foram lavadas em água corrente,

o excesso de água foi retirado com papel toalha e as partes não comestíveis foram removidas; a seguir as hortaliças foram picadas em pedaços pequenos para facilitar a trituração. A 5g de amostra foram adicionados 15 mL da solução extratora; em seguida a amostra foi triturada em microtriturador por 5 minutos e filtrada a vácuo, em papel de filtro. O filtrado foi diluído com água até volume de 25 mL (em balão volumétrico) e centrifugado por 15 minutos a 0,402 xg (4000 rpm). O sobrenadante foi armazenado a 5 °C até a análise cromatográfica, que foi realizada sempre no mesmo dia. Antes da injeção o extrato foi filtrado em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

Cabe ressaltar que as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial durante todo o período de análise, pela utilização de vidrarias âmbar ou papel alumínio e cortinas tipo “blackout”.

2.4. Redução do ácido desidroascórbico

A quantificação do DHA foi realizada por diferença do conteúdo de AA total (após a redução do DHA a AA) e do conteúdo de AA (antes da conversão do DHA).

O DTT foi utilizado como agente redutor do DHA. Quatro diferentes concentrações de DTT foram testadas. A 1 mL do extrato da amostra foi adicionado: (a) 1 mL de solução de DTT a 4, 8, 10 e 50 mM e (b) 1 mL de solução de DTT a 10 e 50 mM, acrescidas de 0,5 mL de tampão Trizma (pH 9,0). O tampão foi adicionado com o objetivo de elevar o pH durante o tempo de reação para cerca de 5,5.

Durante a reação as soluções foram mantidas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por períodos entre 10 e 120 minutos.

Foi testada ainda a adição de ácido sulfúrico 0,4 M, para reduzir o pH da solução antes da injeção cromatográfica.

2.5. Condições Cromatográficas

Foram testadas duas condições cromatográficas. Uma delas, descrita por Giannakourou et al. (2003), consiste em eluição isocrática, detecção na faixa UV, empregando como fase móvel água ultrapura com pH 2.2 ajustado com AMP, a um fluxo de 1 mL/min. Foi testada também a fase móvel proposta por Franke et al. (2004), com alteração do agente tamponador: 1 mM fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) e 1 mM EDTA, pH ajustado para 3.0 com ácido fosfórico (H₃PO₄), fluxo de 1 mL/min, eluição isocrática e detecção a 245 nm. Em ambas as condições foi utilizada coluna Lichospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 µm (Merck, Alemanha). Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, munido de bomba de alta pressão, modelo LC-10AT VP; injetor automático com “loop” de 50 µl, modelo SIL-10AF; detector de arranjo de diodos UV-visível modelo SPD-M10A; controlado pelo “software” Multi System, Class VP 6.12, foi utilizado para as análises.

A identificação do AA nas amostras foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos nas amostras com os obtidos para o padrão de ácido ascórbico, bem como pela comparação dos espectros de absorção, empregando-se o detector de arranjos de diodos.

A quantificação do AA nas amostras foi realizada por meio da curva de calibração. A solução padrão estoque (1 mg/mL de AA) foi preparada em água ultrapura e soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução extratora. Novas soluções padrão foram preparadas diariamente. A concentração real das soluções foi calculada a partir da equação:

$C (\mu\text{g/mL}) = \text{ABS} \times 10^4 / E^{1\%}_{1\text{cm}}$, em que C é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 245 nm), em solução tampão fosfato, pH 2,0 e $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ é o coeficiente de absortividade molar (560) (Ball, 1994).

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização da extração e análise cromatográfica de vitamina C

A extração da vitamina C de couve apenas com água, definitivamente, não se mostrou eficiente, uma vez que a quantidade de AA encontrada foi cerca de 30 vezes menor que a quantidade encontrada quando as amostras foram extraídas com a solução de AMP 4,5%, como pode ser observado na Figura 1. Da mesma forma, a extração das amostras de tomate com água não apresentou bons resultados, sendo que o teor de AA nas amostras extraídas com solução de AMP foi cerca de 40% maior que nas amostras extraídas com água pura. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Franke et al. (2004) em um estudo que quantificou AA em frutas e hortaliças. Segundo os autores, a extração de AA apenas com água é suficiente quando se trata de frutas, mas a adoção deste método para vegetais folhosos revelou causar perda de AA durante o processo de extração, especialmente a alface, cujo pico de AA nem foi detectado. É possível que o AA tenha sido degradado durante a extração com água, ou ainda, que a extração tenha sido incompleta, em razão das diferenças inerentes às hortaliças. No presente estudo, a degradação ou ineficiência da extração do AA durante a extração com água se mostrou bem clara para a couve. Embora a perda de AA durante a extração com água tenha sido menor no tomate, esta perda foi bastante significativa.

Ainda segundo Franke et al. (2004), é admissível supor que durante a extração com água não haja a completa inativação da enzima ascorbato oxidase presente nas hortaliças folhosas. A faixa de pH ótimo de atuação da enzima é entre 5.0 e 6.5 (Saari, Osmana, Selamat, & Fujita, 1999). Nos extratos de couve sem adição de AMP o pH variou entre 5.7 e 6.1, já nos extratos que continham AMP o pH esteve sempre abaixo de 2.0. É provável que nas soluções contendo 4,5% de AMP a ascorbato oxidase seja inativada, uma vez que em pH abaixo de 4 a sua atividade é praticamente nula. Comparando-se a extração com água em couve e tomate, a degradação do AA foi maior nas amostras de couve, possivelmente, porque o pH do extrato encontrava-se na faixa ótima de atuação da ascorbato oxidase. Já nos extratos de tomate, como o pH foi de 4,4, por causa da acidez do próprio tomate, a enzima atuou com menor eficiência e a degradação do AA foi, conseqüentemente, menor. A ascorbato oxidase é apontada como a principal enzima envolvida na degradação enzimática do AA (Lee et al., 2000).

No entanto, observou-se que empregando AMP 4,5% como solução extratora e fase móvel composta por água ultrapura, pH 2,2 ajustado com AMP, por várias semanas, ocorreu perda de qualidade dos dados, com o aparecimento de picos duplos para o AA e perda de qualidade da resolução dos mesmos (Figura 2, letra A). É possível que esta situação tenha ocorrido em virtude do acúmulo de cristais de AMP na coluna cromatográfica, com conseqüente alteração na protonação do AA durante a passagem pela coluna, já que uma alta concentração de íons hidrogênio mantém o AA completamente protonado (Ball, 1994). Outros autores relataram problemas na utilização do AMP. Iwase (2003) cita a dificuldade de dissolver AMP em água deionizada e os problemas durante a pesagem do AMP causados pela sua propriedade higroscópica.

Para contornar esse problema, mantendo o AMP, já que este é considerado um dos melhores ácidos capazes de preservar o AA (Ball, 1994), utilizou-se solução extratora com concentração menor de AMP (3%) e optou-se por elevar o pH da fase móvel de 2,2 para 3,0, empregando H_3PO_4 ao invés de AMP para ajustar o pH. Estas medidas basearam-se no fato de que o H_3PO_4 tem menor tendência à cristalização do que o AMP e um pH muito baixo pode comprometer a durabilidade da coluna de fase reversa. No entanto, com a alteração da fase móvel, a resolução do pico de AA ficou muito ruim, como pode ser observado na Figura 2 (letra B). Mais uma vez a solução extratora foi modificada, passando a utilizar-se uma mistura contendo AMP, ácido acético, ácido sulfúrico e EDTA. Nesse caso, não houve perda de eficiência de extração e a resolução dos picos melhorou sensivelmente com a utilização destas condições (Figura 2, letra C).

3.2. Validação da metodologia

Para construção da curva padrão utilizaram-se volumes crescentes (5 a 50 μ L) de uma solução padrão de AA 50 μ g/ml, cuja pureza obtida foi 97%. Foi encontrada boa linearidade (entre 0,2 e 2 μ g), com coeficiente de determinação elevado ($R^2=0,9994$). O limite de detecção foi de 50 μ g/L, determinado em relação a um pico cuja área foi 3 vezes maior que a linha de base. A repetibilidade do método foi testada por 6 injeções consecutivas de 30 μ L do padrão de AA a 50 μ g/mL. Os resultados na forma de desvio padrão relativo foram 1,70 % para área do pico e 0,59 % para tempo de retenção.

Testes de recuperação foram realizados com a adição de 0,5 a 1,0 mg de AA às amostras de couve e tomate. A recuperação média foi de 90 % para couve (média de 4 repetições, entre 83 e 99 %) e 90 % para tomate (variando entre 85 e 93 %).

3.3. Otimização do processo de redução do ácido desidroascórbico

Diferentes concentrações de DTT e diversos tempos de reação foram utilizados para a redução do DHA presente nas amostras. A adição de 1 mL de DTT (4 ou 8 mM) a 1 mL do extrato de couve e tomate, contendo 4,5 % de AMP, resultou em perda de AA ou em aumentos de no máximo 4 %, depois de aguardado o tempo de reação de 75, 90 e 120 minutos, conforme proposto por Gökmen et al. (2000). Tentou-se então o aumento da concentração de DTT, com utilização de solução a 50 mM. No entanto, os resultados não se alteraram.

No pH das soluções extratoras contendo AMP (1,5 a 2,0) a atuação do DTT foi muito baixa, sendo necessária a elevação do pH dos extratos antes de sua adição, já que esse atua melhor em pH próximo à neutralidade (Okamura, 1980). Para isto foram utilizados de 0,5 a 1,5 mL de tampão Trizma 0,5 M, pH 9,0, para obtenção de pH final entre 5,5 e 6,0. Uma elevação ainda maior do pH foi evitada já que a faixa de estabilidade do AA está entre pH 4 e 6 (Moser & Bendich, 1991). Optou-se pela utilização de tampão Trizma (pH 9,0) porque no volume usado o tampão fosfato (pH 7,0) não foi suficiente para elevar o pH do extrato.

A redução do pH do extrato antes da injeção não se mostrou necessária, quando foi empregada fase móvel acidificada com AMP, pH 2,2, uma vez que o AA mostrou-se estável na solução de pH 6,0 após 50 minutos, como pode ser visto na Figura 3. É possível que a ascorbato oxidase tenha sido inativada durante a extração com a utilização do AMP, o que não permitiu que a enzima voltasse a agir após o retorno ao pH 6,0 durante o tempo de reação do DTT.

Entretanto, como as condições cromatográficas e a solução extratora tiveram de ser alteradas, conforme já mencionado, a forma de utilização do DTT também teve que ser modificada. A injeção das amostras com DTT e tampão Trizma na fase móvel contendo NaH_2PO_4 , EDTA e H_3PO_4 não foi bem sucedida, pois o pico de AA deixou de ser detectado. Para contornar esta situação, foi necessário reduzir o pH da solução antes da injeção. Para tanto se empregou solução 0,4 M H_2SO_4 .

A solução tampão Trizma foi empregada para neutralizar o pH dos extratos, que então, foram adicionados de soluções de DTT a 10 e 50 mM. A quantidade de DTT necessária depende do conteúdo de DHA presente na amostra. Baseados no relato de outros autores (Hernández et al., 2006; Gökmen et al., 2000) e em nossos próprios testes concluiu-se que a utilização de 50 mM de DTT não resultou em maior conversão do que quando se utilizou 10 mM. Optou-se, então, por empregar uma solução de 40 mM de DTT, diluída no próprio tampão. Ao misturar a solução de DTT e tampão à amostra a concentração final de DTT foi de 20 mM. Ou seja, 1 mL do extrato foi adicionado de 1 mL de solução tampão contendo 40 mM de DTT, o que resultou em uma solução em que o DTT foi diluído para 20 mM.

Da mesma forma, não foi necessário um longo tempo de reação. O emprego de 20 mM de DTT necessitou de 10 minutos de reação. Ao se dobrar o tempo de reação para 20 minutos não houve diferença na conversão de DHA.

A conversão do DHA foi realizada, então, da seguinte forma: a 1 mL de amostra foram adicionados 1 mL de tampão Trizma 0,5 M (pH 9,0) contendo 40 mM de DTT. Após 10 minutos de reação, em temperatura ambiente e protegidos da luz, o processo era interrompido com a adição de 0,5 mL de H_2SO_4 0,4 M, obtendo um pH final próximo a 2, e a injeção era realizada imediatamente após.

3.4. Extração e análise de vitamina C em couve com óleo

Para verificar a influência da presença de óleo na extração e análise de vitamina C, amostras semelhantes de couve foram analisadas paralelamente, na forma natural e adicionada de óleo. Não foi aplicado tratamento térmico (refogado) às amostras de couve com óleo para não confundir a influência causada pela presença de óleo e as perdas causadas pelo calor. A extração, conversão do DHA e análise cromatográfica foram realizadas conforme a metodologia otimizada descrita neste trabalho. Foi necessário apenas ajustar o volume de tampão Trizma e H_2SO_4 adicionados: a 1 mL do extrato de couve contendo óleo foi adicionado 1,5 mL de tampão Trizma contendo 40 mM de DTT, para obter pH próximo a 5,5. Para reduzir novamente o pH antes da injeção foi necessária adição de 1,5 mL de H_2SO_4 , 0,4 M.

Observou-se que a adição de óleo não influenciou a extração da vitamina C. O coeficiente de variação médio do conteúdo de AA nas amostras com e sem óleo foi de 1,53%. A recuperação de AA na couve adicionada de óleo foi de 95,5% (média de 2 repetições). Isto permite dizer que o método aqui otimizado pode ser empregado para análise de couve refogada.

3.5. Conteúdo de AA e DHA nas amostras

A Tabela 1 apresenta o conteúdo de AA, DHA e vitamina C total nas amostras analisadas. Observa-se que cerca de 21 % do total de vitamina C da couve encontra-se na forma de DHA e 17 % do total de vitamina C do tomate. Estes valores diferem dos encontrados por Gökmen et al. (2000), em que o

DHA representou cerca 41 % do total de vitamina C do tomate (7,9 mg/100g de AA e 5,4 mg/100g de DHA). Embora não tenham analisado couve, esses autores relataram não ter encontrado AA em hortaliças folhosas como salsa e hortelã, e sim, um elevado conteúdo de DHA (218,4 mg/100g em salsa e 50,3 mg/100g em hortelã). É possível que estes resultados tenham ocorrido porque a extração foi feita apenas com água, o que pode ter acarretado oxidação do AA a DHA durante o processo de extração, com reversão após a adição de DTT. Com a ruptura da estrutura celular dos vegetais, durante a extração, amplia-se a exposição ao oxigênio e a atividade da ascorbato oxidase pode processar-se livremente, já que o pH de extratos de hortaliças folhosas é próximo à neutralidade.

Em hortaliças de pH baixo, como o tomate, a extração com água parece comprometer menos o AA, embora de maneira expressiva. Já em hortaliças folhosas, a extração sem redução do pH leva a oxidação quase total do AA.

Resultados similares aos encontrados neste estudo foram relatados por Wills, Wimalasiri, & Greenfield (1984) em tomates, em que o DHA representou 7% da vitamina C total (18,7 mg\100g de AA e 1,5 mg\100g de DHA). Em outro estudo, que determinou o DHA após a separação cromatográfica e detecção por fluorimetria, a porcentagem de DHA em relação ao conteúdo total de vitamina C foi de apenas 2,4 %.

Infelizmente ainda são poucos os trabalhos que analisaram DHA em hortaliças, restringindo a comparação de resultados. Da mesma maneira, foram encontrados poucos estudos envolvendo análise de AA em couve por CLAE. Rodrigues (2005) relatou valores médios entre 95,3 e 116,4 mg/100g de AA em couve crua e entre 15,9 e 20,4 mg/100g em tomate cru. Para tomate, os valores encontrados no presente trabalho estão dentro da faixa relatada por outros autores, considerando-se a ampla diversidade de cultivares disponíveis (Frenich Garrido et al., 2005; Abushita, & Daood, & Biacs, 2000).

4. Conclusões

A adição de AMP à solução extratora contribui para preservação do AA durante o processo de extração, sendo uma medida indispensável no caso de análise de hortaliças. Entretanto para melhorar a reprodutibilidade do método foi necessário reduzir a proporção de AMP e adicionar outros ácidos e EDTA para estabilizar o AA.

Pequenas quantidades de DTT são necessárias para conversão do DHA a AA, embora seja necessário neutralizar o pH da solução para que a reação se processe de maneira eficiente. O reajuste do pH antes da injeção para cerca de 2.0 se faz necessário.

A metodologia aqui proposta é eficiente na extração de AA de hortaliças, inclusive em hortaliças folhosas adicionadas de óleo e mostrou-se bastante específica. Embora a necessidade de ajustar o pH do extrato para conversão do DHA tenha introduzido mais alguns passos na análise, isto resultou na melhoria da qualidade dos dados obtidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências bibliográficas

- Abushita, A. A., & Daood, H. G., & Biacs, P. A. (2000). Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2075-2081.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15th ed. (pp. 1058-1059). Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Ball, G. F. M. (1994). *Water-soluble vitamin assays in human nutrition*. London: Chapman & Hall.
- Cardoso, M. A., & Penteado, M. V. C. (1994). Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(2), 231-240.
- Franke, A. A., Custer, L.J., Arakaki, C., & Murphy, S. P. (2004). Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 1–35.
- Frenich Garrido, A., Hernández Torres, M. E., Belmonte Vega, A., Martínez Vidal, J. L., & Plaza Bolaños, P. (2005). Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 7371-7376.
- Furusawa, N. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*, 12, 27-29.
- Giannakourou, M. C., & Taoukis, P. S. (2003). Kinetic modeling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food Chemistry*, 83, 33-41.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Ddemir, N., & Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., & González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96, 654-664.
- Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E., Deltoro, V. I., Calatayud, A., & Ramis-Ramos, G. (1998). Determination of L-Ascorbic Acid and Total Ascorbic Acid in Vascular and Nonvascular Plants by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 265, 275–281.
- Iwase, H. (2003). Routine high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods using L-methionine for the pre-analysis sample stabilization. *Talanta*, 60, 1011-1021.
- Kabasakalis, V., Siopidou, D., & Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70, 325–328.
- Kall, M. A., & Andersen, C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 730, 101–711.
- Lee, S. K.; Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207–220.

- Lisiewska, Z., & Kmiecik, W. (1996). Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention. *Food Chemistry*, 57(2), 261-270.
- Mahan, L. K., & Escott-Stump, S. (2005). Vitaminas. In Mahan, L. K., & Escott-Stump, S., *Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia* 11ª ed. (pp. 77-122). São Paulo: Rocca.
- Moser, U., & Bendich, A. (1991). Vitamin C. In Machlin, L. J. (Ed.), *Handbook of vitamins* 2th ed. (pp. 195-232). New York: Marcell Dekker.
- O'Connell, P. J., Gormally, C., Pravda, M., & Guilbault, G. G. (2001). Development of an amperometric L-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 431, 239-247.
- Okamura M. (1980). An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinical Chimica Acta*, 103(3), 259-68.
- Rodrigues, C. M. A. (2005). *Avaliação e controle de perdas de vitamina C em hortaliças preparadas em restaurante comercial e institucional*. Viçosa, 99p. [Tese de Mestrado em Ciência da Nutrição, Federal de Viçosa].
- Saari, N., Osmana, A., Selamat, J., & Fujita, S. (1999). Ascorbate oxidase from starfruit (*Averrhoa carambola*): preparation and its application in the determination of ascorbic acid from fruit juices. *Food Chemistry*, 66, 57-61.
- Sánchez-mata, M. C., Cámara, M., & Díez-Marqués, C. (2003). Extending shelf-life and nutritive value of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), by controlled atmosphere storage: micronutrients. *Food Chemistry*, 80, 317-322.
- Silva, F. O. (2005). Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. *Food Control*, 16, 55-58.
- Tudela, J. A., Espín, J. C., & Gil, M. I. (2002). Vitamin C retention in fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 75-84.
- Versari, A., Mattioli, A., Parpinello, G. P., & Galassi, S. (2004). Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. *Food Control*, 15, 355-358.
- Wills, R. B. H., Wimalasiri, P., & Greenfield, H. (1984). Dehydroascorbic Acid Levels in Fresh Fruit and Vegetables in Relation to Total Vitamin C Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1904(320), 836-838.

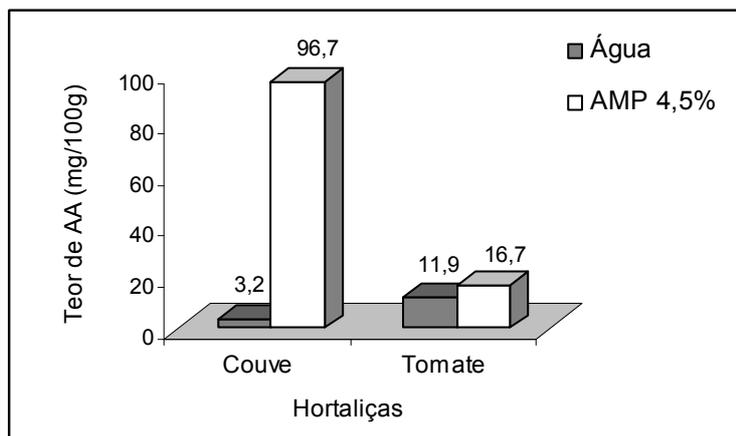


Figura 1. Teor de ácido ascórbico (mg/100g) em couve e tomate. Água: solução extratora composta por água pura. AMP 4,5%: solução extratora composta por ácido metafosfórico 4,5%.

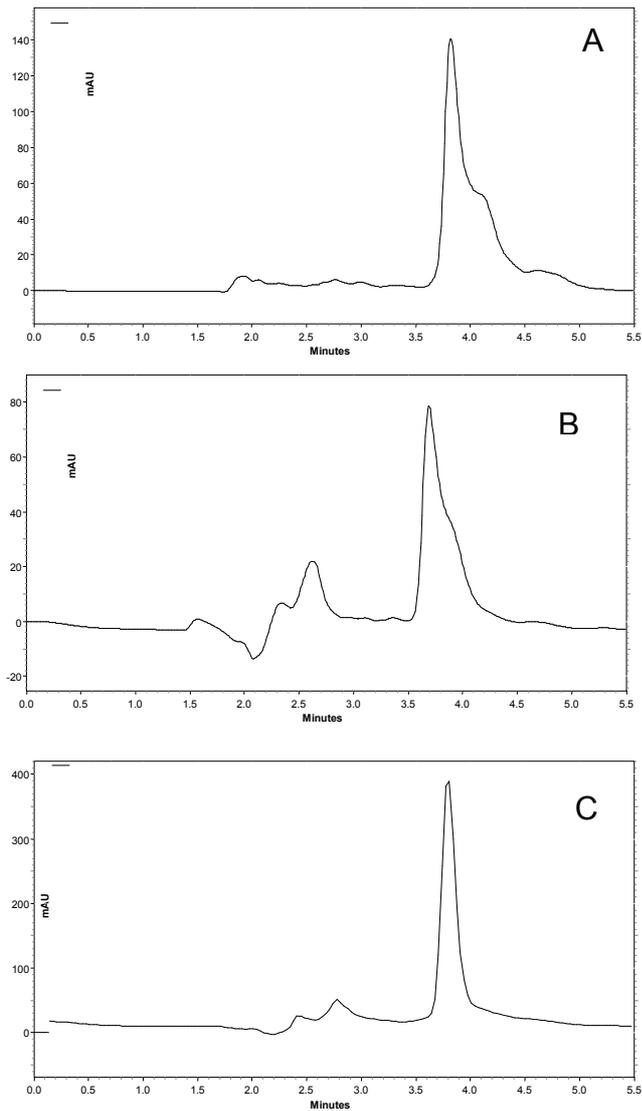


Figura 2. Cromatogramas de amostras de tomate (A) solução extratora AMP 4,5%, fase móvel água acidificada, pH 2,2 com AMP; (B) solução extratora AMP 3%, fase móvel NaH_2PO_4 1 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado para 3,0 com H_3PO_4 ; (C) solução extratora AMP 3%, ácido acético 8 %, H_2SO_4 0,3 N e 1 mM EDTA, fase móvel NaH_2PO_4 1 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado para 3,0 com H_3PO_4 .

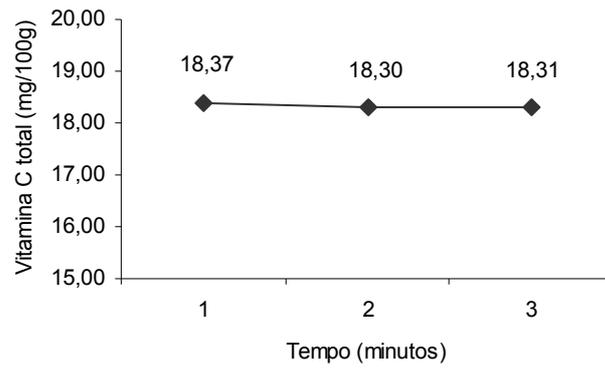


Figura 3. Teor de vitamina C total (mg/100g) em tomate, extraído com AMP 4,5%, após 10, 30 e 50 minutos de reação com ditiotreitól e tampão trizma.

Tabela 1. Conteúdo de AA, DHA e vitamina C total em hortaliças.

Hortaliça	AA (mg/100g)	DHA (mg/100g)	Vit C (mg/100g)
Couve	83,38 \pm 18,67	24,21 \pm 4,94	113,47 \pm 17,92
Tomate	16,54 \pm 3,77	3,03 \pm 0,58	17,94 \pm 0,75

Média de 5 repetições \pm desvio-padrão

4.3. Artigo 3

***Controle de Perdas de Vitamina C e
Carotenóides em Tomate durante
Armazenamento e Preparo***

Resumo

Acredita-se que boas práticas de manipulação poderiam minimizar a perda de nutrientes em hortaliças, decorrentes do preparo. Para selecionar práticas no armazenamento, preparo e distribuição de tomate, foram testados armazenamento à 10 °C e 24 °C (durante 24 e 72 horas), tempos de sanitização (15, 45 e 75 minutos), tipos de corte (fatias e cubos) e tempo de exposição para consumo (0, 30 e 60 minutos). Ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C total, licopeno e β -caroteno foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sob refrigeração, a retenção de AA durante o armazenamento, por 24 horas, foi 8 % superior. A retenção de DHA foi maior em temperatura ambiente. A retenção de licopeno foi menor em temperatura de refrigeração. Não houve diferença entre os cortes e os tempos de exposição empregados. As retenções após as condições de armazenamento e processamento selecionadas ficaram entre 78 e 86% para vitamina C, 53 e 81% para licopeno e 74 e 83% para β -caroteno.

Palavras-chave: ácido ascórbico, ácido desidroascórbico, licopeno, β -caroteno, tomate, manipulação.

1. Introdução

O tomate é uma das hortaliças mais consumidas no mundo todo. Na última Pesquisa de Orçamentos Familiares realizada no Brasil, o consumo de tomate representou cerca de 37 % do consumo total de hortaliças frutosas (legumes) (Instituto, 2004). O tomate possui versatilidade culinária, podendo ser consumido “in natura” em saladas, e cozido, na forma de sucos, purês e extratos. Além disso, apresenta alta palatabilidade e valor nutritivo reconhecidos (Borguini, 2002).

Embora não seja, a rigor, um alimento rico em vitamina C, o tomate, em razão do elevado consumo, é fonte importante desta vitamina na alimentação. A vitamina C é hidrossolúvel e a sua principal forma biologicamente ativa é o ácido L-ascórbico (AA). No entanto sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico (DHA), também apresenta atividade vitamínica (Lee & Kader, 2000).

A vitamina C atua como um excelente antioxidante no organismo por causa da sua capacidade de doar elétrons a radicais livres (Padayatty & Levine, 2000). Embora até o momento não seja possível afirmar uma relação direta entre o consumo de vitamina C e as doenças cardiovasculares, o consumo de frutas e hortaliças, ao contrário, tem sido cada vez mais apontado como um fator de prevenção para essas doenças e para o câncer (Burr, Appleby, Key, & Thorogood, 2001; Lampe, 1999).

A cor atraente do tomate é causada pela presença de carotenóides, em especial o licopeno. O licopeno é considerado o carotenóide com maior poder antioxidante (Miller, Sampson, Candeias, Bramley & Rice-Evans, 1996). Estudos indicam a associação entre dietas ricas em tomate e seus produtos e redução nos riscos de diversas formas de câncer (Bramley, 2000; Stefani, Oreggia, Boffetta, Deneo-Pellegrini, Ronco & Mendilaharsu, 2000), bem como com a atenuação de fatores envolvidos no processo de aterosclerose (Rissanen, Voutilainen, Nyssönen, Salonen, Kaplan & Salonen, 2003; Martin, Wu & Meydani, 2000).

Outro importante carotenóide presente no tomate é o β -caroteno, que possui atividade provitamínica A. Igualmente, tem sido apontado como participante na prevenção e tratamento de câncer, doenças cardiovasculares e alterações do sistema imunológico (Tapiero, Townsend & Tew, 2004; Williams, Boileau, Zhou, Clinton & Erdman, 2000; Wang & Russell, 1999; Santos et al., 1996).

No entanto, esses nutrientes podem ser perdidos durante as operações realizadas entre a colheita e o consumo dessa hortaliça. Entre os fatores que interferem na degradação de carotenóides estão a sua estrutura, a quantidade de oxigênio disponível, a atividade de água, o grau de luminosidade, a temperatura, o pH e a presença de antioxidantes e prooxidantes (Britton, 1992). De forma semelhante, o AA pode ser facilmente oxidado, especialmente na presença de oxigênio, íons metálicos, pH alcalino e temperaturas elevadas (Lee & Kader, 2000).

Muitos dos fatores que interferem na estabilidade da vitamina C e carotenóides em hortaliças estão presentes durante seu armazenamento e preparo para consumo, seja em pequena ou larga escala.

O clima tropical, que pode aumentar a biossíntese de carotenóides, também pode acelerar-lhes a destruição durante o manejo pós-colheita e armazenamento (Rodriguez-Amaya, 1999b).

As etapas de pré-preparo dos alimentos podem produzir perdas variáveis de vitaminas, dependendo principalmente do tempo de manipulação. Quanto maior for esse tempo, maior será o contato do alimento com condições de degradação. Além disso, a perda de vitaminas hidrossolúveis também pode se dar por lixiviação durante etapas de higienização dos alimentos, em virtude do contato direto com a água. A forma como os vegetais são picados pode influenciar a retenção de vitaminas e provitaminas. O descascamento e o fatiamento de vegetais é responsável pela remoção de vitaminas associadas aos tecidos superficiais e à exposição das vitaminas localizadas nos tecidos internos a fatores relacionados com as perdas, como oxigênio e luz (Combs, 1998). Apesar de o tomate ser amplamente consumido cru, sem nenhum tipo de processamento térmico, o conteúdo de nutrientes pode ser alterado em razão do rompimento da matriz celular. Nos vegetais intactos a estrutura celular confere certa estabilidade aos carotenóides. No entanto, durante o processamento essa estrutura é comumente rompida, expondo os carotenóides aos fatores responsáveis por sua destruição, principalmente ao oxigênio (Rodriguez-Amaya, 1993). Entretanto, poucos são os estudos desenvolvidos para avaliar condições de processamento que não incluam tratamento térmico.

A utilização de boas práticas de manipulação no controle de perda do valor nutricional pode ser de grande utilidade. No entanto é necessário estabelecer quais medidas podem ser tomadas para controlar a perda de vitaminas, sem ferir critérios já definidos, relativos à qualidade microbiológica.

Dessa forma torna-se importante não apenas avaliar as perdas de vitaminas durante o processamento das hortaliças, mas, principalmente, chegar à proposição de boas práticas de manipulação para minimizar essas perdas. Os objetivos deste estudo foram quantificar o conteúdo de AA, DHA, vitamina C total, licopeno e β -caroteno em tomates antes e após o preparo e testar, em laboratório, diferentes condições, durante armazenamento, higienização, fatiamento e distribuição de tomate para consumo, visando à seleção daquelas que resultariam em maior retenção de vitamina C e carotenóides.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e outros materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: metanol e acetonitrila (Tedia, USA), acetato de etila (Mallinckrodt, USA), ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Alemanha) e ácido acético (Vetec, Brasil). A água ultrapura foi produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, USA). Os demais reagentes foram de grau de pureza para análise (p.a.).

A filtração das amostras foi realizada em papel de filtro (Quanty, Brasil) e antes da injeção as amostras e soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 μ m de porosidade (Millipore, Brasil).

O padrão de ácido L-ascórbico foi adquirido da Vetec (Brasil). Os padrões de licopeno e β -caroteno foram isolados por cromatografia de coluna aberta.

2.2. Material

Tomates (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Santa Cruz, foram adquiridos de um produtor da cidade de Viçosa, MG, Brasil, sendo cultivados em condições semelhantes ao longo do experimento. Para a primeira etapa do experimento empregou-se tomate colhido entre agosto e setembro de 2005. Para a segunda etapa, os tomates foram colhidos entre novembro e dezembro

de 2005. Os tomates foram colhidos no mesmo dia das análises, sendo escolhidos aqueles visualmente maduros, de coloração vermelha uniforme, simulando a utilização imediata para consumo. Os tomates foram transportados até o Laboratório de Análise de Vitaminas da UFV embalados em sacos plásticos, em temperatura ambiente.

2.3. *Preparação das amostras*

O estudo foi dividido em 2 etapas. Na etapa 1 foram testados os efeitos das condições de armazenamento, em ambiente refrigerado (refrigerador doméstico, temperatura média de 10 °C) e em temperatura ambiente (média de 24 °C) e o tempo de imersão de 15, 45 e 75 minutos em solução sanitizante. O objetivo foi sanitizar conforme a recomendação do fabricante do produto clorado (15 minutos) e simular a sanitização realizada sem controle de tempo, que frequentemente ocorre em restaurantes. Entre 6 e 7 unidades de tomate por tratamento foram embaladas em sacos plásticos e armazenadas nas condições de armazenamento descritas, por 24 horas (simulando o tempo utilizado na prática). Após 24 horas essas amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo (6,6 g de sanitizante dissolvidos em 1 L de água) por 15, 45 e 75 minutos. Em seguida foram enxaguadas em água corrente e secas com papel toalha. Imediatamente os tomates foram homogeneizados com o auxílio de um processador tipo doméstico.

Na etapa 2 foram testados os efeitos das condições de armazenamento, em ambiente refrigerado e em temperatura ambiente, o tipo de corte da hortaliça para preparo e o tempo de espera entre o término do preparo e o consumo (0, 30 e 60 minutos).

Seis a sete tomates foram embalados e armazenados por 72 horas, para cada tratamento. Depois de transcorrido esse período as amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha, sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15 minutos, enxaguadas em água corrente, secas em papel toalha e manualmente fatiadas. Para obter amostras semelhantes, cada unidade de tomate foi cortada ao meio, de forma que cada fruto fosse picado segundo as duas formas em teste: a) em cubos de cerca de 3 cm x 3 cm e b) em fatias de cerca de 1 cm de espessura. Os tomates assim picados foram acondicionados em vasilhames de polietileno e permaneceram expostos em temperatura ambiente (média de 24 °C) por 0, 30 e 60 minutos.

Os tomates que não foram submetidos a sanitização (controle) foram lavados em água corrente e secos em papel toalha.

2.4. *Extração de vitamina C e carotenóides*

A extração da vitamina C foi realizada conforme metodologia previamente otimizada (dados ainda não publicados). Às alíquotas de cerca de 5g de amostra foram adicionados 15 mL de solução extratora composta por ácido metafosfórico 3 %, ácido acético 8 %, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1 mM. Em seguida a amostra foi triturada em microtriturador por 5 minutos e filtrada a vácuo, em papel de filtro. O filtrado foi diluído com água até volume de 25 mL e centrifugado por 15 minutos a 0,402 xg (4000 rpm). O sobrenadante foi armazenado a 5 °C até a análise cromatográfica, que foi realizada sempre no mesmo dia. Antes da injeção o extrato foi filtrado em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

O processo de extração dos carotenóides foi realizado segundo Rodriguez, Raymundo, Lee, Simpson & Chichester (1976), com algumas modificações.

Cerca de 5 g de amostra foram triturados na presença de 70 mL de acetona resfriada e em seguida transferidos para 50 mL de éter de petróleo. A concentração do extrato foi feita em evaporador rotativo, na faixa de temperatura entre 35 e 37 °C. Em seguida, os carotenóides foram novamente dissolvidos em 25 mL de éter de petróleo. Os pigmentos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, em congelador a -5 °C, até a análise dos carotenóides (cerca de 24 horas).

Testes de recuperação de AA, licopeno e β -caroteno foram realizados pela adição de padrão às amostras de tomate, na proporção de cerca de 50 % do conteúdo médio original das amostras.

Cabe ressaltar que em ambas as análises as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial durante todo o processo, pela utilização de vidrarias âmbar e papel alumínio.

2.5. Condições cromatográficas

2.5.1. Determinação de ácido ascórbico e carotenos

Para análise de AA empregou-se a metodologia descrita por Franke, Custer, Arakaki & Murphy (2004), com alterações. Fase móvel: 1 mM fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e 1 mM EDTA, pH ajustado para 3.0 com ácido fosfórico (H_3PO_4), fluxo de 1 ml/min, eluição isocrática e detecção a 245 nm. Coluna Lichospher 100 RP18, 250mm x 4mm, 5 μm (Merck, Alemanha).

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, munido de bomba de alta pressão, modelo LC-10AT VP; injetor automático com "loop" de 50 μl , modelo SIL-10AF; detector de arranjo de diodos UV-visível modelo SPD-M10A; controlado pelo "software" Multi System, Class VP 6.12.

A identificação do AA nas amostras foi realizada por comparação entre os tempos de retenção obtidos nas amostras com os obtidos para o padrão de AA, analisados sob as mesmas condições, bem como por comparação entre os espectros de absorção, empregando-se o detector de arranjos de diodos.

A solução padrão estoque (1 mg/ml de AA) foi preparada em água ultrapura e soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução extratora. Novas soluções padrão foram preparadas diariamente. A concentração real das soluções foi calculada a partir da equação:

$C (\mu\text{g/ml}) = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$, em que C é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 245 nm), em solução tampão fosfato, pH 2,0, e $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de absorvidade molar (560) (Ball, 1994).

Para construção da curva padrão empregada para quantificação do AA utilizou-se a injeção de soluções crescentes de uma solução padrão a 50 $\mu\text{g/ml}$.

Para carotenos a análise baseou-se nas condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana, Stringheta, Brandão & Azeredo (1998), com algumas modificações. Foram utilizados os mesmos equipamentos descritos para vitamina C e coluna VP-ODS 150mm x 4,6mm, Shimadzu. A fase móvel foi composta por metanol, acetato de etila e acetonitrila (50:40:10); fluxo: de 1,0 mL/minuto e detecção a 450 nm.

Para construção das curvas padrão foi feita a injeção de volumes crescentes de soluções padrão de β -caroteno e de licopeno, independentemente. A quantificação dos padrões de carotenos é descrita no item 2.5.2.

A determinação da faixa de linearidade foi feita pela injeção, em duplicata, de volumes crescentes das soluções padrão de AA, licopeno e β -caroteno, nas mesmas condições cromatográficas usadas para análise das amostras.

O limite de detecção foi determinado como o pico cuja razão entre a área do pico e o ruído da linha de base foi de 3 (Rodriguez-Amaya, 1999a).

2.5.2. Isolamento dos padrões de β -caroteno e licopeno

Os padrões de β -caroteno e licopeno foram isolados de extrato concentrado de cenoura e tomate, respectivamente, por cromatografia de coluna aberta, segundo Rodriguez-Amaya (1999a). Para separação de β -caroteno, cerca de 20 g de cenoura foram triturados com acetona e posteriormente transferidos para éter de petróleo. Foi utilizada coluna cromatográfica empacotada com óxido de magnésio e celite (1:2) e fase móvel composta por 2 % de éter etílico em éter de petróleo.

Para obtenção do padrão de licopeno cerca de 20 g de tomate foram preparados conforme descrito anteriormente para β -caroteno. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e celite (1:1) e o recheio ativado por 4 horas a 110 °C. As fases móveis utilizadas continham concentrações crescentes de éter etílico e éter de petróleo (2 a 5 %) e concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (5 a 100 %). Para retirada total do licopeno foi utilizada uma solução de 10 % de água em acetona.

Os parâmetros usados para confirmar a identificação dos padrões foram: ordem de eluição das frações na coluna, coloração dos pigmentos eluídos, tempo de retenção em CLAE e espectros de absorção característicos. A pureza das soluções foi verificada por CLAE e a quantificação foi realizada por espectrofotometria, baseando-se na absorvância máxima, segundo a lei de Lambert-Beer. Os coeficientes de absorvidade utilizados foram 2592 para β -caroteno e 3450 para licopeno. Os comprimentos de onda de máxima absorção foram β -caroteno: 450 nm e licopeno: 469 nm, em éter de petróleo (Rodriguez-Amaya, 1989).

2.6. Conversão e quantificação do ácido desidroascórbico

A conversão do DHA a AA foi realizada conforme metodologia previamente otimizada (dados ainda não publicados). Foi adicionado 1 mL de tampão Trizma 0,5 M (pH 9,0) contendo 40 mM de DTT a 1 mL do extrato do tomate. A adição de tampão ao extrato elevou o pH para próximo à neutralidade. A concentração final de DTT durante a reação foi de 20 mM, uma vez que 40 mM (6,17 mg) de DTT foram diluídos em 2 mL de líquido (1 mL de tampão e 1 mL de amostra). A reação ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 10 minutos. Depois de transcorrido o tempo foram adicionados 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,4 M para reduzir novamente o pH antes da injeção cromatográfica.

A quantificação do DHA foi realizada por diferença do conteúdo de AA total (após a conversão do DHA a AA) e do conteúdo de AA (antes da conversão do DHA).

2.7. Determinação de sólidos solúveis totais

Foram determinados os teores de sólidos solúveis totais empregando-se refratômetro digital (Hexis). A amostra de tomate foi esmagada manualmente e cerca de duas gotas foram transferidas para o refratômetro. Os resultados foram expressos em graus Brix.

2.8. Desenho experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, com as duas condições de armazenamento (temperatura de refrigeração e temperatura ambiente) nas parcelas e o tempo de imersão em solução sanitizante (15, 45 e 75 minutos) nas sub-parcelas (etapa 1). O experimento foi realizado com três repetições na etapa 1 e cinco repetições na etapa 2. Na etapa 2 as duas condições de armazenamento (em temperatura de refrigeração e ambiente) e os dois tipos de corte (meia fatia e cubos) foram organizados em arranjo fatorial, nas parcelas, e o tempo de espera para distribuição (0, 30 e 60 minutos) nas sub-parcelas.

A análise de variância e demais testes estatísticos foram realizados utilizando procedimentos do SAS (Statistical Analysis System), licenciado para a UFV, 2005 (SAS, 1994).

3. Resultados e discussão

3.1. Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis totais, registrados na forma de graus Brix, estiveram entre 4,11 e 5,29. A análise estatística mostrou que a variação no teor de sólidos solúveis dos tomates não foi significativa ($P > 0,05$) entre as temperaturas de armazenamento, tempos de sanitização, formas de fatiamento e tempos de espera para distribuição utilizados.

Os valores registrados são comparáveis aos relatados em outros estudos com diferentes cultivares de tomate (George, Kaur, Khurdiya & Kapoor, 2004; Borguini, 2002; Toor, Savage & Lister, 2006). Vale lembrar que a concentração de sólidos solúveis tende a aumentar com o avanço da maturação do fruto, especialmente em razão da hidrólise de polissacarídeos e biossíntese de outros compostos (Borguini, 2002).

3.2. Características das curvas-padrão, recuperação dos padrões e separação qualitativa.

As curvas padrão apresentaram boa linearidade na faixa de concentrações utilizada. Os coeficientes de correlação foram 0,9994 para AA, 0,9959 para licopeno e 0,9905 para β -caroteno.

A recuperação média de AA foi de 90 % (4 repetições), licopeno 94 % (3 repetições) e β -caroteno 80% (4 repetições).

O limite de detecção encontrado foi de 50 $\mu\text{g/L}$ para AA, 56 $\mu\text{g/L}$ para licopeno e 46 $\mu\text{g/L}$ para β -caroteno.

A Figura 1 apresenta a separação do AA em amostra de tomate usada como controle e a separação do licopeno e do β -caroteno em amostra de tomate fatiado.

3.3. Conteúdo de AA, DHA, vitamina C total, licopeno e β -caroteno

Os conteúdos médios de AA, DHA, vitamina C, licopeno e β -caroteno das amostras de tomate, nas etapas 1 e 2, são apresentadas na Tabela 1 e 2. Os conteúdos de AA em tomate tipo Santa Cruz, variando entre 11,30 e 19,99 mg/100g, encontram-se próximos aos valores relatados por outros autores. Os teores de licopeno variaram entre 2447,02 e 6444,98 $\mu\text{g/100g}$ e os de β -caroteno entre 101,88 e 166,90 $\mu\text{g/100g}$.

Observa-se na Tabela 1 que, em média, entre 4 e 26 % do total de vitamina C do tomate encontram-se na forma de DHA. São poucos os trabalhos que analisaram o conteúdo total de vitamina C (AA e DHA) em tomates. Os resultados encontrados estão de acordo com o relatado por Wills, Wimalasiri & Greenfield (1984) para tomates, em que o DHA representou 7 % da vitamina C total (18,7 mg/100g de AA e 1,5 mg/100g de DHA). Em outro trabalho, o DHA representou cerca de 22 % do conteúdo total de vitamina C em tomate (Vanderslice, Higgs, Hayes & Block, 1990).

Entretanto, Gökmen, Kahraman, Ddemir & Acar (2000), encontraram porcentagens mais elevadas de DHA no tomate (cerca de 40 % do total de vitamina C), também empregando DTT como agente redutor, mas em metodologia diferente da utilizada no presente estudo. Já Kall & Andersen (1999) relataram uma porcentagem de 2 % de DHA em relação ao conteúdo total de vitamina C.

Ao comparar os resultados de composição química de tomates é necessário levar em consideração a vasta diversidade de cultivares disponíveis. Analisando quatro cultivares de tomate, Frenich Garrido, Hernández Torres, Belmonte Vega, Martínez Vidal & Plaza Bolaños (2005), encontraram ampla variação do conteúdo de vitamina C. Os valores foram 18,0 mg/100g em tomate "Raf", 15,7 mg/100g em tomate "Cereja", 9,7 mg/100g em tomate "Rambo" e 12,6 mg/100g em tomate "Daniela". Abushita, Daood & Biacs (2000) também estudaram diferentes variedades de tomate, reportando valores entre 15,0 e 21,0 mg/100g. Em outro trabalho, realizado no Havaí, o conteúdo médio de AA em tomates, de cultivar não especificado, foi de 10,0 mg/100g (Franke et al., 2004). Em estudo realizado na cidade de Viçosa, MG, o tomate apresentou conteúdo de AA entre 14,7 e 24,6 mg/100g (Rodrigues, 2005).

Segundo o United States Department of Agriculture, o tomate cru contém cerca de 12,7 mg/100g de AA, 2573,0 µg/100g de licopeno e 449,0 µg/100g de β-caroteno (U.S.D.A, 2004). No Brasil, os cultivares "Carmem" e "Débora" apresentaram teores médios de vitamina C de 21,9 e 28,9 mg/100g, de β-caroteno entre 185,5 e 227,8 µg/100g e de licopeno entre 2900,0 e 3500,0 µg/100g, respectivamente (Borguini, 2002).

Tomates para salada de diferentes variedades apresentaram conteúdo de licopeno entre 5182,0 e 8474,0 µg/100g e de β-caroteno entre 285,0 e 617,0 µg/100g (Abushita et al., 2000). Em estudo realizado no Brasil, em tomate Santa Cruz o conteúdo médio de licopeno foi de 3110,0 µg/100g e de β-caroteno foi de 510,0 µg/100g (Tavares e Rodriguez-Amaya, 1994). No município de Viçosa, tomates coletados em três estações do ano apresentaram em média 599,0 µg/100g de β-caroteno (Campos, Pinheiro-Sant'Ana, Souza, Stringheta & Chaves, 2006).

A variação do conteúdo de carotenóides em tomates está intimamente relacionada à variedade e ao grau de maturação, já que são esses os principais pigmentos responsáveis pela alteração de cor durante o amadurecimento (Lois, Rodríguez-Cencepción, Gallego, Campos & Boronat, 2000).

De acordo com os resultados, neste estudo, uma porção de 60 g de tomate, após armazenamento sob refrigeração, por 72 horas, sanitização e fatiamento, pode fornecer cerca de 9,13 mg de vitamina C, o que corresponde a 10% da recomendação de vitamina C para um homem adulto (90 mg), segundo Institute of Medicine (IOM, USA) (2000). Utilizando o fator de conversão para β-caroteno recomendado pelo IOM (2001), em que 12 µg de β-caroteno equivalem a 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE), pode-se calcular o

valor de vitamina A do tomate. Uma porção de 60 g de tomate analisado nesta pesquisa fornece 8 µg de RAE.

3.4. Retenção de vitamina C e carotenóides e seleção de práticas de manipulação

As porcentagens de retenção de AA, vitamina C total, licopeno e β-caroteno foram calculadas de acordo com a equação: $100 - [(contéudo\ inicial - contéudo\ final) / contéudo\ inicial \times 100]$, em que o conteúdo inicial corresponde à amostra controle e o conteúdo final às amostras após os tratamentos.

Segundo a Tabela 1 é possível observar que houve diferenças no conteúdo de AA, DHA, vitamina C, licopeno e β-caroteno do tomate, de acordo com a forma de armazenamento e sanitização. Entretanto, não houve interação significativa entre a temperatura de armazenamento e o tempo de sanitização em nenhuma das variáveis em estudo (conteúdo e retenção de AA, DHA, Vit. C, licopeno e β-caroteno). A temperatura de armazenamento por 24 horas e o tempo de sanitização não influenciaram significativamente os teores e as retenções de licopeno e β-caroteno dos tomates (Tabela 1).

O conteúdo de AA foi estatisticamente diferente entre os tempos de sanitização, elevando-se com o aumento do tempo de sanitização, independentemente da temperatura de armazenamento, o que pode ser atribuído à redução do DHA a AA, uma vez que o DHA apresentou comportamento inverso ao do AA. Na Tabela 1 observa-se que o conteúdo de DHA reduziu-se com o aumento do tempo de sanitização, independentemente da temperatura ($\alpha=0,05$).

Em relação à retenção de AA, esta foi estatisticamente diferente entre os tempos de sanitização e maior em temperatura de refrigeração, como apresentado na Tabela 1.

O armazenamento sob refrigeração beneficiou a retenção de AA, uma vez que a retenção média foi de 89 % à temperatura de 10 °C e de 81 % à temperatura ambiente (média de 24 °C).

Percebe-se pela Figura 2 que houve uma tendência de elevação do conteúdo e retenção de AA com o aumento do tempo de sanitização de 15 para 45 minutos e posterior estabilização do conteúdo, enquanto o conteúdo de DHA tendeu a reduzir-se. Estes resultados são inesperados, uma vez que o aumento do tempo de exposição à solução clorada, de característica oxidante, possivelmente não elevaria o conteúdo de AA. Da mesma maneira, o maior tempo de contato com a água aumentaria as chances de perdas de AA por lixiviação. No entanto, possivelmente a casca do tomate exerceu efeito protetor, neste caso, em que permaneceu intacta durante o processo de sanitização, evitando as perdas para a água.

Na etapa 2 o tomate foi armazenado por um período mais longo (72 horas) e a sanitização foi realizada por 15 minutos. Embora o teor de AA tenha aumentado na sanitização realizada por 45 e 75 minutos, optou-se pelo tempo de 15 minutos, uma vez que esse é considerado suficiente para a eliminação de microorganismos, sem consumo excessivo de tempo. Além disso, os resultados encontrados não justificariam aumentar o tempo de sanitização para elevar o conteúdo de AA, uma vez que não são conclusivos.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados encontrados na etapa 2. Não houve interação significativa entre a temperatura de armazenamento (Tabela 2), o tipo de corte e o tempo de exposição em nenhuma das variáveis em estudo (Tabela 3). A temperatura de armazenamento, o tipo de corte e o tempo

de exposição não interferiram no conteúdo e retenção de AA, vitamina C e β -caroteno.

A retenção de DHA foi maior à temperatura ambiente, independentemente do corte e tempo de exposição do tomate após o fatiamento, como pode ser observado na Figura 3. De maneira semelhante, o conteúdo e retenção de licopeno foram menores à temperatura de refrigeração, independentemente do fatiamento e do tempo de exposição.

A Figura 4 apresenta as relações entre os conteúdos de AA, DHA e vitamina C total na fase 1 e 2. Observa-se que o AA é a forma principal da vitamina C no tomate, havendo um decréscimo no seu conteúdo após 15 minutos de sanitização e posterior incremento com a elevação do tempo de sanitização. Na fase 2, observa-se que em temperatura de refrigeração a porcentagem de vitamina C total na forma de AA foi maior do que em temperatura ambiente. O aumento do teor de DHA nas amostras de tomate armazenadas em temperatura ambiente por 72 horas, possivelmente se deve à maior oxidação do AA em temperaturas elevadas com formação de DHA. Embora não significativa, houve menor retenção de AA no tomate que permaneceu à temperatura ambiente.

Em tomates ocorre aumento do conteúdo de carotenóides, especialmente de licopeno, durante o processo de amadurecimento (Rodriguez-Amaya, 1997). A carotenogênese é maior em temperaturas mais elevadas (Rodriguez-Amaya, 1999b); isso explicaria o menor conteúdo de licopeno nos tomates armazenados em temperatura de refrigeração. Em um estudo conduzido por Abushita, Hebshi, Daood & Biacs (1997) em tomates, a concentração de β -caroteno aumentou proporcionalmente ao avanço do processo de amadurecimento, e em concordância com a acumulação de pigmento vermelho.

O armazenamento sob refrigeração melhorou a retenção de AA, sendo, portanto, recomendado. No entanto, o tomate submetido à refrigeração deve estar maduro, para que a carotenogênese, que progride durante o armazenamento, não seja comprometida. O aumento do tempo de armazenamento não reduziu a retenção de vitamina C, β -caroteno e licopeno em ambas as temperaturas. Após 24 horas de armazenamento a retenção média (nas duas temperaturas) foi de 78 % para vitamina C, 74 % para β -caroteno e 53 % para licopeno, enquanto que após 72 horas a retenção foi de 94 % para vitamina C, 79 % para β -caroteno e 78 % para licopeno.

Apesar das medidas tomadas para padronizar o grau de maturação dos tomates utilizados, podem ter havido diferenças. O processo de amadurecimento continuou durante o tempo de armazenamento e as perdas podem ter sido mascaradas pela síntese, especialmente de licopeno.

Visando simular o que ocorre no processamento doméstico e em restaurantes, os tomates foram fatiados e permaneceram expostos à temperatura ambiente por até 60 minutos. Contudo, tanto o tipo de corte quanto o tempo de exposição não tiveram influência sobre os compostos estudados. Sahlin, Savage & Lister (2004) estudaram tomates crus fatiados, marinados em azeite e vinagre por 20 minutos, e relataram retenção de AA da ordem de 48 % e de cerca de 60 % de licopeno. É possível que no presente trabalho a não adição de temperos, como azeite e vinagre, tenha resultado em menores perdas, apesar da exposição à luz, temperatura ambiente e oxigênio.

Em estudo que comparou as perdas de AA em tomate após cada etapa do processamento em restaurante comercial e institucional, a retenção final foi de cerca de 50 % (Moraes, Cota, Pinheiro-Sant'Ana, Campos & Rodrigues, 2005),

bem abaixo das retenções observadas no presente estudo (cerca de 85 %). Em ambos os restaurantes a maior porcentagem de perda ocorreu durante o armazenamento. No restaurante comercial, em que o armazenamento foi feito por 3 a 4 dias a 20-27 °C, a retenção foi de 82 %, enquanto no restaurante comercial, em que os tomates foram armazenados por 7 dias a 8-10 °C, a retenção foi de 75 %, demonstrando que o tempo de armazenamento teve maior influência do que a temperatura. Na atual pesquisa não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no valor de AA entre o armazenamento a temperatura ambiente e de refrigeração por 3 dias. É admissível que se o tempo de armazenamento fosse maior, diferenças entre os tratamentos teriam sido observadas.

Ainda segundo Moraes et al. (2005), houve perdas importantes de AA durante o período entre o final do preparo e o consumo. No restaurante institucional, o tomate em rodela permaneceu por 2 horas a 5-8 °C e no restaurante comercial permaneceu por 3 horas a 20-27 °C. No presente estudo, embora o tomate tenha permanecido à temperatura ambiente após o fatiamento, o tempo máximo de exposição foi de 1 hora, o que potencialmente resultou em retenções maiores.

Em outro estudo, também em restaurantes institucional e comercial, a adoção de medidas de controle favoreceu a retenção de AA em tomate servido em restaurante comercial; a retenção passou de 69 % para 88 % após a adoção do controle. Entre as medidas adotadas constaram o armazenamento a 15 °C, substituindo o armazenamento em temperatura ambiente, e o controle da temperatura (15 °C) e do tempo entre o fatiamento e o consumo para máximo de 60 minutos, em substituição a exposição à temperatura ambiente por até 3 horas (Rodrigues, 2005).

A vitamina C e os carotenóides foram escolhidos para este estudo porque apresentam natureza diferente, o que permite prever perdas associadas aos compostos hidro e lipossolúveis. Visto os resultados encontrados, ainda não foi possível determinar quais práticas de manipulação seriam mais indicadas para o fatiamento e a distribuição de tomate para consumo, uma vez que não houve diferença entre os cortes e os tempos de exposição empregados. Apesar disso, sabe-se que o aumento do tempo e da superfície de exposição ao oxigênio e a luz podem elevar as perdas de nutrientes em alimentos. Desta forma, recomenda-se principalmente reduzir o tempo entre o preparo e o consumo. Quanto ao armazenamento, é possível afirmar que a melhor medida é conservar os tomates maduros sob refrigeração, e manter como critério a temperatura em torno de 10 °C. Esta é uma temperatura razoavelmente comum tanto em refrigeradores de pequeno quanto de grande porte, diferentemente de temperaturas de refrigeração muito baixas, difíceis de serem atingidas em países tropicais sem que haja um controle rigoroso do equipamento, o que nem sempre é rotina em restaurantes.

Mesmo nas condições selecionadas, ocorreram perdas de nutrientes no tomate. Na primeira etapa do experimento, a retenção de vitamina C, licopeno e β -caroteno, após o armazenamento refrigerado e sanitização por 15 minutos, foi de cerca de 78, 53 e 74 %, respectivamente. Já na segunda etapa, o armazenamento refrigerado, sanitização por 15 minutos, corte em cubos ou fatias, e 60 minutos de exposição antes do consumo, resultaram em retenções médias de 86 % de vitamina C, 81 % de licopeno e 83 % de β -caroteno. Apesar de muitos pesquisadores afirmarem que as perdas de vitaminas hidrossolúveis são, em geral, superiores às perdas relacionadas a compostos lipossolúveis (Combs, 1998), creditando maior estabilidade aos carotenóides, o inverso foi

observado neste trabalho. Isto demonstra a influência da matriz alimentar que está sendo estudada. O pH ácido natural do tomate, em torno de 4,0, mantém o AA relativamente estável (Lee & Kader, 2000), o que provavelmente contribuiu para melhor retenção.

4. Conclusões

O tomate não se apresentou como fonte importante de β -caroteno e conseqüentemente tem baixo valor de vitamina A, mas confirmou-se como uma importante fonte de vitamina C e licopeno da dieta, sobretudo por ser amplamente consumido em diversas refeições, sendo bem aceito inclusive por crianças. Além disso, o tomate é, em geral, encontrado a preços acessíveis a boa parte da população no Brasil e é produzido ao longo de todo o ano.

O armazenamento e preparo do tomate tendem a reduzir seu valor nutricional. O armazenamento sob refrigeração mostrou-se o mais indicado. Apesar disso, é conveniente que os tomates sejam assim armazenados depois de maduros.

Segundo este estudo, a sanitização em solução clorada por 15 minutos não foi a que melhor reteve o AA, mas sua recomendação deve-se ao fato de ser esse tempo considerado suficiente para sanitização do vegetal.

O tipo de corte e tempo de exposição após o preparo não interferiram no valor nutricional do tomate, neste trabalho, o que não significa que não tenham ocorrido perdas, mas que estas foram semelhantes entre os tratamentos utilizados. Apesar disso, recomenda-se que o consumo seja realizado o mais próximo possível da finalização do preparo, para minimizar a exposição do alimento.

Assim como os demais perigos que comprometem a qualidade dos alimentos, a perda do valor nutricional está relacionada à saúde dos consumidores e não é menos importante do que as demais, embora suas conseqüências só sejam percebidas em médio e longo prazo. Por isso, é importante quantificar perdas e estabelecer boas práticas de manipulação que preservem o valor nutricional dos alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- Abushita, A. A., Daood, H. G., Biacs, P. A. (2000). Change in Carotenoids and Antioxidant Vitamins in Tomato as a Function of Varietal and Technological Factors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2075-2081.
- Abushita, A. A., Hebshi, E. A., Daood, H. G., Biacs, P. A. (1997). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry*, 60(2), 207-212.
- Ball, G. F. M. (1994). Water-soluble vitamin assays in human nutrition. (p. 416), London: Chapman & Hall.
- Borguini, R. G. (2002). Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bramley, P. M. (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 54, 233-236.
- Britton, G. (1992). Carotenoids. In Hendry, G. F. (Ed.), *Natural foods colorants*. (pp. 141-148). New York: Blackie.
- Burr, M., Appleby, P., Key, T., Thorogood, M. (2001). Plasma ascorbic acid and risk of heart disease and cancer. *Lancet*, 357, 2135–2136.
- Campos, F. M., Pinheiro-Sant’ana, H. M., Souza, P. M., Stringheta, P. C., Chaves, J. B. P. (2006). Pró vitaminas A em hortaliças comercializadas no mercado formal e informal da cidade de Viçosa-MG, em três estações do ano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 33-40.
- Combs, G. F. Jr. (1998). *The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health* 2th ed. New York: Academic Press.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Arakaki, C., Murphy, S. P. (2004). Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 1–35.
- Frenich Garrido, A., Hernández Torres, M. E., Belmonte Vega, A., Martínez Vidal, J. L., Plaza Bolaños, P. (2005). Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 7371-7376.
- George, B., Kaur, C, Khurdiya, D. S., Kapoor, H. C. (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersicum esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 84, 45–51.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Ddemir, N., Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004). *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil*. Rio de Janeiro.
- IOM - U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (2001). *Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington, D.C., National Academy Press.
- IOM - U. S. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (2000). *Dietary intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington, D.C., National Academy Press.

- Kall, M. A., & Andersen, C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 730, 101–711.
- Lampe, J. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 475S–490S.
- Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology Technology*, 20, 207-220.
- Lois, L. M., Rodríguez-Cencepción, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 22(6), 503-513.
- Martin, K. R., Wu, D., Meydani, M. (2000). The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 150: 265–274.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384: 240-242.
- Moraes, F. A., Cota A. M., Pinheiro-Sant'Ana H. M., Campos, F. M, Rodrigues, C. M. A. (2005). Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (submetido).
- Padayatty, S. J., Levine, M. (2000). Vitamin C and myocardial infarction: the heart of the matter. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1027-1028.
- Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Stringheta, P. C., Brandão, S. C. C., Azeredo, R. M. C. (1998). Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 61(1-2), 145-151.
- Rissanen, T. H., Voutilainen, S., Nyyssönen, K., Salonen, R., Kaplan, G. A., Salonen, J. T. (2003). Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 133–138.
- Rodrigues, C. M. A. (2005). *Avaliação e controle de perdas de vitamina C em hortaliças preparadas em restaurante comercial e institucional*. Viçosa, 2005. 99p. [Tese de Mestrado em Ciência da Nutrição, Federal de Viçosa].
- Rodriguez, D. B., Raymundo, L. C., Lee, T., Simpson, K. L., Chichester, C. O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annual Botanic*, 40, 615-624.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1989). Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis*, 5, 191-225.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1993). Nature and distribution of carotenoids in foods. In Charalambous, F. (Ed.), *Shelf life of foods and beverages – chemical biological, physical and nutritional aspects* (pp. 547-589). Amsterdam, Elsevier Science.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1997) *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Washington: OMNI.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1999a). A guide for carotenoids analysis in foods. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press.

- Rodriguez-Amaya, D.B. (1999b). Latin American Food Sources of Carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(1-S), 74-84.
- Sahlin, E., Savage, G. P., Lister, C. E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 635-647.
- Santos, M. S., Meydane, S. N., Leka, L., Wu, D., Fotouhi, N., Meydani, M. Hennekens, C. H., Gaziano, J. M. (1996). Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 772-777.
- SAS Institute Inc. (1994). SAS/STAT User's Guide. Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc. 846p.
- Stefani, E., Oreggia, F., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A., Mendilaharsu, M. (2000). Tomatoes, tomato-rich foods, lycopene and cancer of the upper aerodigestive tract: a case-control in Uruguay. *Oral Oncology*, 36, 47-53.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 100-110.
- Tavares, C. A. & Rodriguez-Amaya, D. B. (1994). Carotenoid Composition of Brazilian Tomatoes and Tomato Products. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 27, 219-224.
- Toor, R. K., Savage, G. P., Lister, C. E. (2006). Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 1-10.
- USDA United States Department of Agriculture (2004). Nutrient database for standard reference. Release 17. Home page <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>
- Vanderslice, J. T., Higgs, D. J., Hayes, J. M., Block, G. (1990). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods-as eaten. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3, 105-118.
- Wang X. D., Russell R. M. (1999). Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutrition Review*, 8, 263-272.
- Williams, A. W., Boileau, T. W. M., Zhou, J. R., Clinton, S. K., Erdman, J. W. (2000). Beta-carotene modulates human prostate cancer cell growth and may undergo intracellular metabolism to retinol. *Journal of Nutrition*, 130(4), 728-732.
- Wills, R. B. H., Wimalasiri, P., Greenfield, H. (1984). Dehydroascorbic Acid Levels in Fresh Fruit and Vegetables in Relation to Total Vitamin C Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1904(320), 836-838.

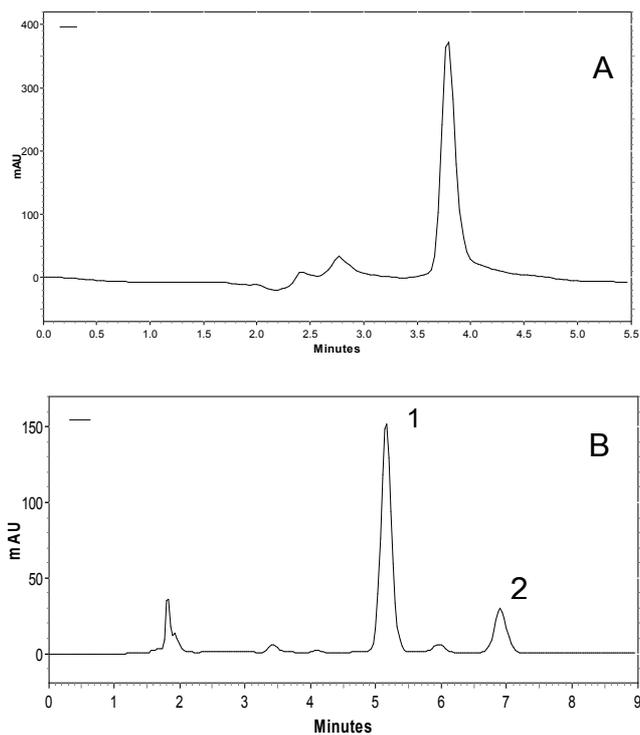


Figura 1. Análise por CLAE de ácido ascórbico em tomate controle (A) e licopeno (1) e β -caroteno (2) em tomate fatiado (B). Condições cromatográficas descritas no texto.

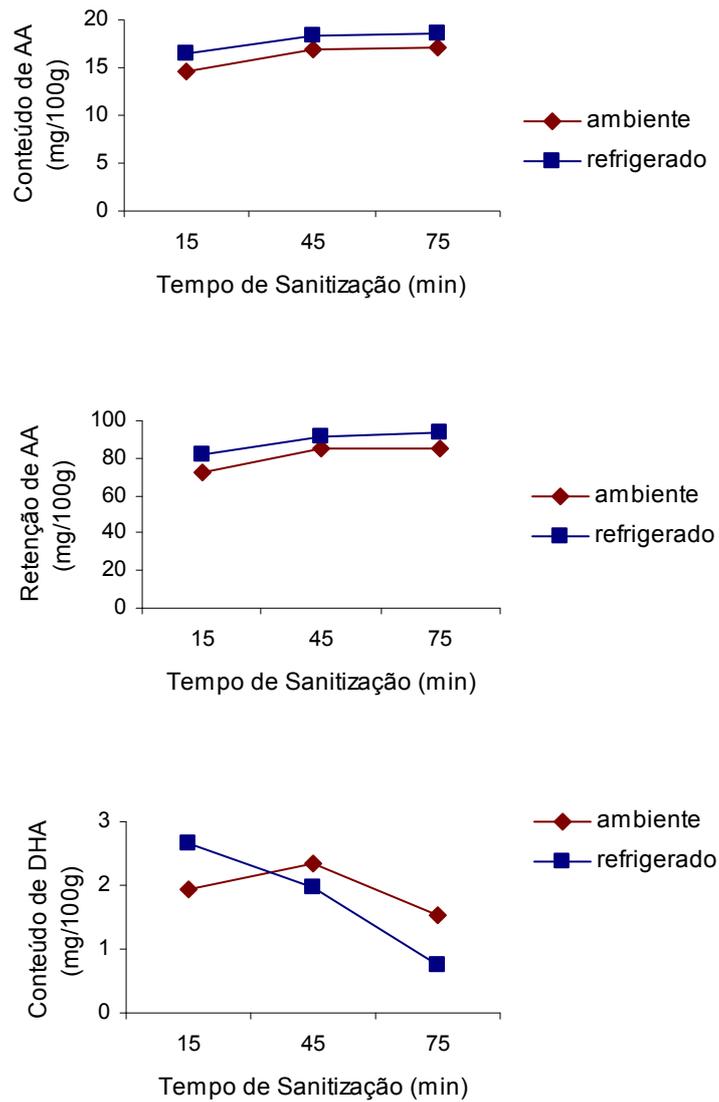


Figura 2. Conteúdo e retenção de ácido ascórbico (AA) e conteúdo de ácido desidroascórbico (DHA) em tomate após armazenamento por 24 horas e sanitização.

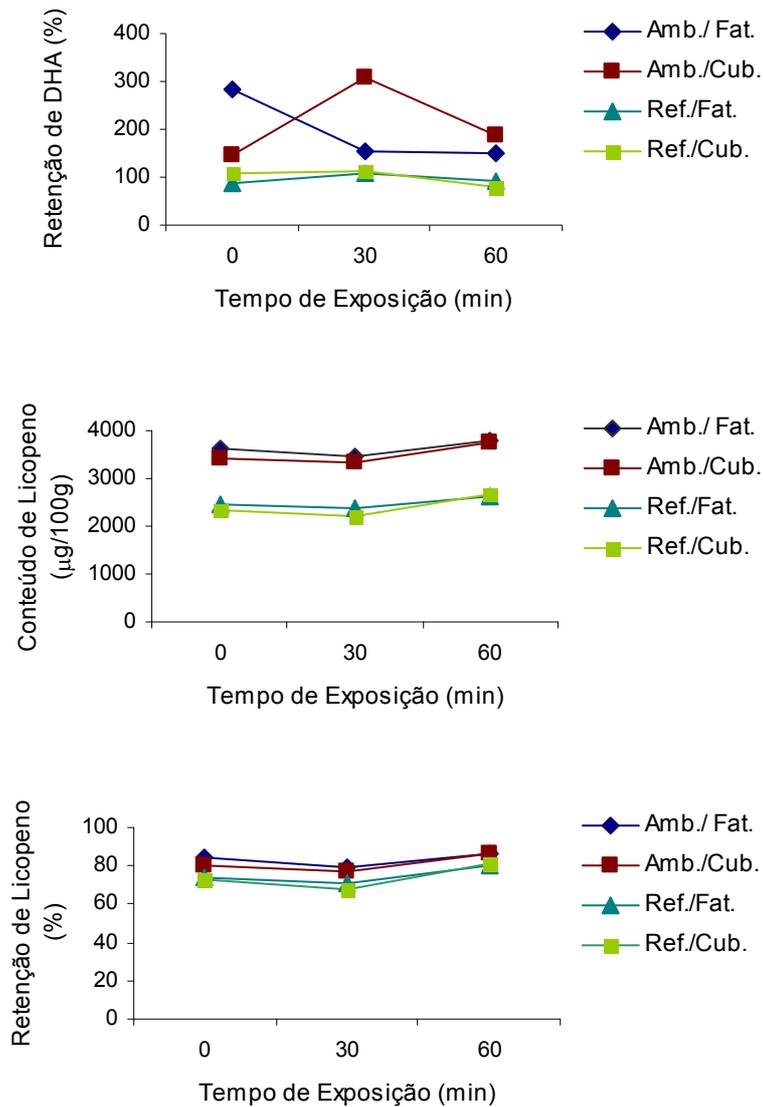


Figura 3. Retenção de ácido desidroascórbico (DHA) e conteúdo e retenção de licopeno em tomate após armazenamento por 72 horas, sanitização, fatiamento e exposição. Amb./Fat.: temperatura ambiente (24 °C) e corte em fatias. Amb./Cub.: temperatura ambiente (24 °C) e corte em cubos. Ref./Fat.: temperatura de refrigeração (10 °C) e corte em fatias. Ref./Cub.: temperatura de refrigeração (10 °C) e corte em cubos.

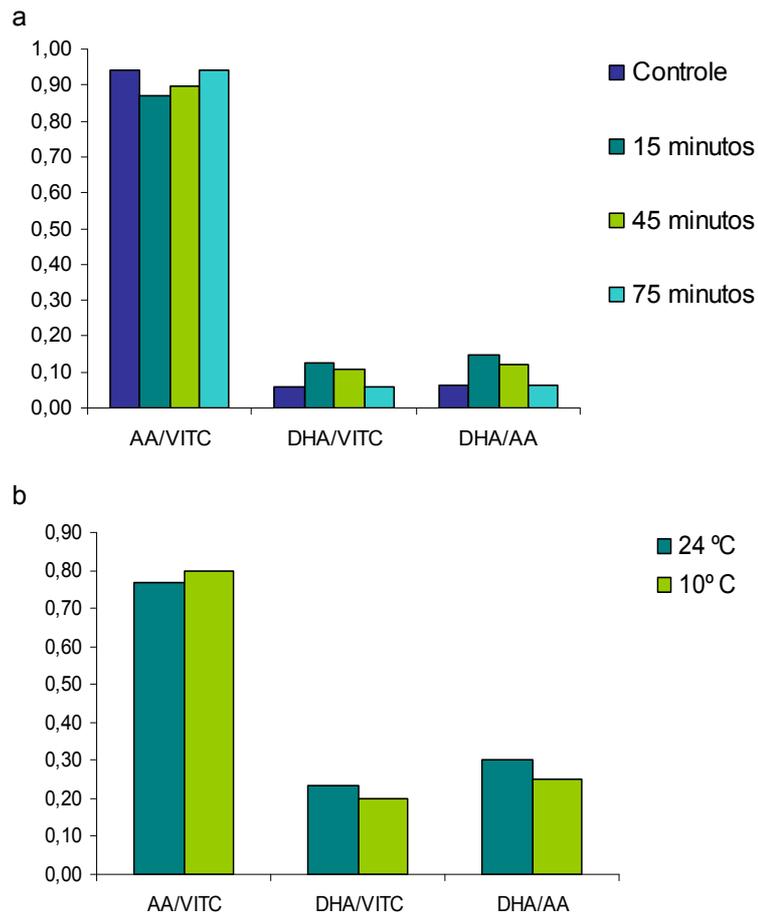


Figura 4. Relações entre conteúdos de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA) e vitamina C total (VITC) em tomate. (a) Fase 1. Sanitização por 15, 45 e 75 minutos. (b) Fase 2. Armazenamento a 10 °C e 24 °C.

Tabela 1. Conteúdo, retenção e análise de variância de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C total, licopeno e β -caroteno em tomate, após 24 horas de armazenamento e sanitização.^a

<i>Temperatura</i>		<i>Ambiente</i>			<i>Refrigerada</i>			<i>Fonte de Variação^d</i>			
<i>Tempo Sanitização</i>	<i>Controle^c</i>	<i>15 min</i>	<i>45 min</i>	<i>75 min</i>	<i>15 min</i>	<i>45 min</i>	<i>75 min</i>	<i>TA</i>	<i>Erro a^e</i>	<i>TS</i>	<i>Erro b^e</i>
AA (mg/100g)	19,99 \pm 3,95	14,69 \pm 4,58	16,96 \pm 2,21	17,16 \pm 3,93	16,45 \pm 4,03	18,31 \pm 4,22	18,59 \pm 2,66	NS	37,79	P<0,05	1,71
Retenção AA (%) ^f		72,43 \pm 8,37	85,56 \pm 5,41	85,60 \pm 4,76	82,00 \pm 6,64	91,25 \pm 5,26	93,67 \pm 5,03	P<0,01	5,19	P<0,05	52,19
DHA (mg/100g) ^g	1,25 \pm 1,17	1,94 \pm 0,38	2,35 \pm 0,63	1,52 \pm 1,22	2,65 \pm 1,29	1,96 \pm 1,46	0,76 \pm 0,38	NS	2,39	P<0,05	0,54
Vitamina C (mg/100g)	25,13 \pm 6,67	16,63 \pm 4,35	19,31 \pm 1,58	18,69 \pm 3,30	19,11 \pm 2,79	20,09 \pm 2,75	19,34 \pm 2,13	NS	21,44	NS	2,32
Retenção Vitamina C (%) ^f		68,15 \pm 19,60	80,20 \pm 19,26	78,48 \pm 25,06	79,51 \pm 21,53	82,41 \pm 15,85	80,93 \pm 22,76	NS	1210,38	NS	48,94
Licopeno (μ g/100g)	6444,98 \pm 2920,72	3306,92 \pm 1876,31	3492,78 \pm 1752,02	3619,18 \pm 1378,33	3920,97 \pm 1618,34	2825,50 \pm 1762,40	3706,16 \pm 1809,41	NS	11700073,56	NS	1141460,19
Retenção Licopeno (%) ^f		49,95 \pm 11,67	54,46 \pm 19,52	60,65 \pm 3,90	53,35 \pm 9,62	42,35 \pm 15,97	59,25 \pm 28,57	NS	1237,29	NS	1807,26
β -caroteno (μ g/100g)	155,14 \pm 8,57	101,88 \pm 41,13	113,11 \pm 18,34	122,61 \pm 6,19	113,64 \pm 25,60	116,13 \pm 31,81	117,91 \pm 25,50	NS	1229,76	NS	3850,03
Retenção β -caroteno (%) ^f		66,27 \pm 29,04	73,46 \pm 15,42	79,32 \pm 8,13	73,64 \pm 19,93	74,91 \pm 21,02	76,75 \pm 40,11	NS	790,84	NS	1618,66

^a Média de 3 repetições \pm desvio-padrão. ^b Temperatura de armazenamento: ambiente (24 °C), refrigeração (10 °C). ^c Controle: não sofreu armazenamento e sanitização. ^d Probabilidade: NS: não significativo; P<0,05: significativo com $\alpha=5\%$; P<0,01: significativo com $\alpha=1\%$ pela análise de variância. TA = temperatura de armazenamento. TS = tempo de sanitização. ^e Quadrado médio. ^f Retenção = $100 - [(controle - tratamento) / controle \times 100]$. ^g DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) – AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

Tabela 2. Conteúdo e retenção de ácido ascórbico (AA), desidroascórbico (DHA), vitamina C, licopeno e β -caroteno em tomate preparado após 72 horas de armazenamento. ^{ab}

	Temperatura ambiente ^c	Temperatura refrigeração ^c
AA (mg/100g)	12,06 \pm 3,59 a	11,80 \pm 1,65 a
Retenção AA (%) ^d	82,07 \pm 22,06 a	87,00 \pm 7,52 a
DHA (mg/100g) ^e	3,65 \pm 3,68 a	2,95 \pm 0,84 a
Vitamina C (mg/100g)	15,71 \pm 3,61 a	14,75 \pm 1,98 a
Retenção Vitamina C (%) ^d	98,54 \pm 19,94 a	88,83 \pm 8,74 a
Licopeno (μ g/100g)	3559,12 \pm 70,82 a	2447,02 \pm 60,65 b
Retenção Licopeno (%) ^d	82,30 \pm 9,93 a	74,58 \pm 14,68 b
β -Caroteno (μ g/100g)	166,90 \pm 22,51 a	153,52 \pm 24,81 a
Retenção β -Caroteno (%) ^d	76,35 \pm 13,68 a	82,15 \pm 12,23 a

^a Média de 30 observações \pm desvio-padrão. ^b Amostras armazenadas por 72 horas, sanitizadas por 15 minutos, cortadas em cubos ou fatias e expostas a temperatura ambiente por 0, 30 ou 60 minutos. ^c Temperatura de armazenamento: ambiente (24 °C), refrigeração (10 °C). Análise de variância: médias seguidas pela mesma letra, na linha, não são estatisticamente diferentes ($P>0,05$). ^d Retenção = $100 - [(controle - tratamento) / controle \times 100]$. ^e DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) – AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

Tabela 3. Conteúdo, retenção e análise de variância de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C total, licopeno e β -caroteno em tomate fatiado após diferentes tempos de exposição a temperatura ambiente após o preparo.^{ab}

Tipo de fatiamento ^c	Fatias				Cubos			Fonte de variação ^f				
	Controle ^e	0 minutos ^d	30 minutos	60 minutos	0 minutos ^d	30 minutos	60 minutos	TA	TC	Erro a ^g	TE	Erro b ^g
AA (mg/100g)	14,20 +2,23	11,67 ±3,51	12,28 ±1,97	12,62 ±1,81	11,30 ±3,31	11,40 ±3,44	12,30 ±1,66	NS	NS	16,08	NS	4,99
Retenção de AA (%) ^h		82,74 ±18,67	86,60 ±6,61	89,05 ±4,17	80,45 ±20,53	81,14 ±20,82	87,25 ±9,84	NS	NS	459,60	NS	212,96
DHA (mg/100g) ⁱ	2,58 +0,87	4,03 ±3,27	2,85 ±0,75	2,77 ±1,11	3,00 ±1,00	4,52 ±3,87	2,64 ±1,33	NS	NS	10,30	NS	5,92
Vitamina C (mg/100g)	16,26 +1,36	15,70 ±2,62	15,14 ±2,36	15,39 ±2,63	14,30 ±3,90	15,92 ±3,15	14,94 ±2,59	NS	NS	15,56	NS	6,51
Retenção Vitamina C (%) ^h		96,50 ±12,05	93,03 ±10,41	94,46 ±11,07	88,53 ±22,55	97,74 ±14,97	91,84 ±11,98	NS	NS	344,53	NS	223,68
Licopeno (μ g/100g)	3800,09 +796,38	3044,85 ±723,51	2918,02 ±877,78	3196,72 ±735,74	2883,68 ±237,24	2766,86 ±607,21	3208,29 ±783,29	P<0,001	NS	1033338,11	NS	220376,87
Retenção Licopeno (%) ^h		79,04 ±11,79	75,29 ±13,90	83,53 ±12,68	76,56 ±10,22	72,37 ±12,27	83,85 ±13,75	P<0,05	NS	164,32	NS	168,00
β -Caroteno (μ g/100g)	206,04 +38,08	160,10 ±20,31	153,77 ±25,64	165,43 ±24,27	167,14 ±30,70	160,96 ±26,28	153,87 ±20,29	NS	NS	1288,45	NS	294,24
Retenção β -Caroteno (%) ^h		78,94 ±10,40	76,21 ±16,04	82,09 ±14,54	81,94 ±12,86	79,58 ±12,34	76,75 ±15,60	NS	NS	449,09	NS	64,12

^a Média de 10 observações \pm desvio-padrão. ^b Amostras armazenadas por 72 horas, sanitizadas por 15 minutos, cortadas em cubos ou fatias e expostas a temperatura ambiente por 0, 30 ou 60 minutos. ^c Fatias de 1cm de espessura e cubos de 3 cm. ^d Tempo de exposição a temperatura ambiente (24 °C). ^e Controle: não sofreu armazenamento, sanitização e fatiamento. ^f Probabilidade: NS: não significativo; P<0,05: significativo com α = 5%; P<0,01: significativo com α =1% pela análise de variância. TA = temperatura de armazenamento. TC = tipo de corte. TE = tempo de exposição. ^g Quadrado médio. ^h Retenção = 100 - [(controle - tratamento) / controle x 100]. ⁱ DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) - AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

4.4. Artigo 4

***Práticas de manipulação para controle de
perdas de vitamina C e carotenóides em
couve***

Resumo

O conhecimento a respeito das alterações no conteúdo de nutrientes em hortaliças após a colheita e durante o preparo ainda é limitado apesar dos estudos realizados. O objetivo deste estudo foi selecionar práticas de manipulação para controle de perdas de vitamina C (ácido ascórbico e desidroascórbico) e β -caroteno em couve durante o armazenamento, sanitização, fatiamento e distribuição para consumo. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método de análise empregado. A retenção de β -caroteno foi maior a 10 °C do que a 23 °C após 24 horas de armazenamento. A sanitização por tempo superior a 15 minutos influenciou negativamente a retenção de ácido ascórbico nas amostras armazenadas sob refrigeração. O aumento do tempo de espera entre a cocção e o consumo da couve refogada elevou as perdas de ácido ascórbico tanto na couve fatiada em tiras quanto na couve rasgada. O armazenamento sob refrigeração, o controle do tempo de sanitização e do tempo entre o preparo e o consumo são, portanto recomendados.

Palavras –chave: ácido ascórbico, ácido desidroascórbico, β -caroteno, couve refogada.

1. Introdução

Vitaminas e pró-vitaminas que atuam como antioxidantes no organismo humano têm sido intensamente estudadas, principalmente quanto ao potencial benéfico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e câncer (Tapiero et al., 2004; Kurl et al., 2002; Khaw et al., 2001). Entre essas estão a vitamina C e o β -caroteno. Ressalta-se, entretanto, que alguns estudos sugerem um efeito positivo do consumo de alimentos fontes destes antioxidantes e não de suplementos nutricionais (Liu, 2003; Lampe, 1999). Dessa forma, destaca-se a importância da determinação destes nutrientes em alimentos crus e após o preparo.

A principal forma biologicamente ativa da vitamina C é o ácido L-ascórbico (AA), podendo ser reversivelmente oxidada a ácido desidroascórbico (DHA), que também apresenta atividade vitamínica (Lee & Kader, 2000).

Além da atividade antioxidante, o β -caroteno, presente em alimentos de origem vegetal, apresenta outra função importante que é a sua conversão em vitamina A, esta exclusivamente encontrada em alimentos de origem animal. A vitamina A participa dos processos de crescimento, diferenciação de tecidos, manutenção do tecido epitelial e da visão (Mahan & Escott-Stump, 2005). O Brasil encontra-se entre os países onde a hipovitaminose A ainda é um problema de saúde pública (Ramalho et al., 2002; Souza & Vilas Boas, 2002), sendo importante o estímulo ao consumo de hortaliças de custo acessível e fontes de provitamina A, como a couve.

As hortaliças, especialmente folhosas verdes, são fontes importantes de vitamina C e β -caroteno (Rodrigues, 2005; Franke et al., 2004; Moreira et al., 2005; Godoy e Rodriguez-Amaya, 1998). Entretanto, estes compostos instáveis podem ser perdidos durante o armazenamento e preparo das hortaliças. Conforme salientam Rodrigues e Pinheiro-Sant'Ana (2003), nas estações mais quentes do ano o armazenamento em temperatura ambiente pode ser prejudicial para o valor nutricional de alimentos, especialmente em países de clima tropical.

Segundo Rios e Penteado (2003), o AA é muito susceptível a oxidação química e enzimática que ocorrem durante o processamento, cozimento e armazenamento dos alimentos. De maneira semelhante, o β -caroteno pode oxidar-se na presença de luz, calor e metais (Rodriguez-Amaya, 1997), condições comuns durante o processamento.

Poucos são os estudos a respeito da influência das etapas de pré-preparo na retenção de vitaminas em hortaliças. A higienização de vegetais em água corrente pode resultar em perdas, e estas são aumentadas se os vegetais são deixados de molho por períodos longos. O descascamento, a retirada de folhas externas e o fatiamento de vegetais são responsáveis pela remoção de vitaminas associadas aos tecidos superficiais e pela exposição das vitaminas localizadas nos tecidos internos a fatores relacionados com as perdas (Combs, 1998).

Os estudos para desenvolvimento de medidas de controle de perdas de vitaminas em alimentos ganharam notoriedade com o interesse dos pesquisadores na relação entre alimentos e saúde. A aplicação dessas medidas de controle não permite eliminar a perda de vitaminas em alimentos, mas é uma ferramenta que permite manter sob controle essa perda. Assim, é possível padronizar condições de preparo por meio da utilização de boas práticas de manipulação para minimizar

os fatores que predispõem à perda de vitaminas e que estão relacionados ao processamento dos alimentos para consumo. Conhecendo a extensão das perdas é possível planejar cardápios que se complementem de forma a atingir a ingestão diária recomendada de vitaminas.

A couve destaca-se entre as hortaliças folhosas ricas em vitamina C e carotenóides em virtude da facilidade de produção praticamente o ano todo (Kawashima & Valente Soares, 2003) e consumo em grande parte do território brasileiro. Especialmente no Estado de Minas Gerais, boa parte da couve é consumida refogada, uma forma de preparo rápida, mas que emprega temperatura alta.

O objetivo deste estudo foi analisar o conteúdo de vitamina C e β -caroteno em couve fresca e preparada e testar, em laboratório, diferentes condições de uso habitual, durante armazenamento, higienização, fatiamento, cocção e distribuição de couve, visando à seleção daquelas que resultariam em maior retenção de vitamina C e carotenóides.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental e análise estatística

O estudo foi dividido em 2 etapas. Na etapa 1 foram testados os efeitos das condições de armazenamento, em ambiente refrigerado (refrigerador doméstico, temperatura média de 10 °C) e em temperatura ambiente (média de 23 °C) e o tempo de imersão de 15, 45 e 75 minutos em solução sanitizante. Na etapa 2 foram testados os efeitos das condições de armazenamento, em ambiente refrigerado e em temperatura ambiente, o tipo de corte da hortaliça (em tiras e rasgada) para preparo (cocção) e o tempo de espera entre o término do preparo e a distribuição (0, 30 e 60 minutos).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, com as duas condições de armazenamento nas parcelas e o tempo de imersão nas sub-parcelas (etapa 1) e as duas condições de armazenamento e os dois tipos de corte, em arranjo fatorial, nas parcelas e o tempo de espera nas sub-parcelas (etapa 2). Foram realizadas 3 repetições na etapa 1 e 5 repetições na etapa 2.

Para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, foi empregada a análise de variância ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando procedimentos do Statistical Analysis System (SAS), licenciado para a UFV, 2005 (SAS, 1994).

2.2. Preparação das amostras

A couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) cultivar Manteiga, foi adquirida de um produtor local da cidade de Viçosa, MG, Brasil. As folhas de couve, de tamanho padrão comercial, foram colhidas no fim do dia anterior às análises e permaneceram até a manhã seguinte (cerca de 12 horas) armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A couve foi transportada até o Laboratório de Análise de Vitaminas da Universidade Federal de Viçosa, embalada em sacos plásticos e em temperatura ambiente. Na etapa 1, dois a três molhos de couve foram embalados em sacos plásticos e armazenados nas condições de armazenamento descritas. Após 24 horas estas amostras foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha. Os molhos foram divididos

em três partes e sanitizados em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15, 45 e 75 minutos. Em seguida as folhas foram enxaguadas em água corrente e secas com papel toalha. Um processador de vegetais tipo doméstico foi utilizado para homogeneizar as amostras. As análises de vitamina C e β -caroteno foram realizadas antes e após os tratamentos.

Na etapa 2, dois a três molhos de couve foram embalados e armazenados por 24 horas. Depois de transcorrido este período as amostras foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha, sanitizadas em solução contendo 200 ppm de cloro ativo por 15 minutos, enxaguadas em água corrente, secas em papel toalha e fatiadas manualmente. Cada folha de couve foi cortada ao meio longitudinalmente, sendo uma das metades fatiada em tiras com cerca com 0,3 cm de largura e a outra metade rasgada. Em seguida as amostras fatiadas foram refogadas em óleo sem adição de tempero, por 3 minutos. Foram empregados 14 mL de óleo de soja para cada 100 g de couve e uma pequena porção de água foi adicionada durante o processo, apenas para evitar que as folhas se queimassem. As amostras de couve refogada foram acondicionadas em vasilhames de polietileno e permaneceram expostas em temperatura ambiente por 0, 30 e 60 minutos.

2.3. Reagentes e outros materiais

Foi utilizada água ultrapura produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, USA); reagentes grau HPLC: metanol e acetonitrila (Tedia, USA), acetato de etila (Mallinckrodt, USA), ditiotreitól (DTT) (Sigma Aldrich, Alemanha) e ácido acético (Vetec, Brasil). Os demais reagentes eram de grau de pureza para análise.

O padrão de ácido L-ascórbico foi adquirido da Vetec (Brasil) e o padrão de β -caroteno foi isolado de cenoura por cromatografia de coluna aberta.

A filtração das amostras foi realizada em papel de filtro (Quanty, Brasil) e antes da injeção as amostras e soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 μ m de porosidade (Millipore, Brasil).

2.4. Isolamento do padrão de β -caroteno e cálculo do valor de vitamina A

O procedimento para isolar o padrão de β -caroteno foi realizado conforme metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (1999), que consiste em isolar o padrão de um extrato concentrado de cenoura por cromatografia de coluna aberta. Cerca de 20 g de cenoura foram triturados com acetona e posteriormente transferidos para éter de petróleo e separados em coluna cromatográfica empacotada com óxido de magnésio: celite (1:2). A fase móvel empregada foi 2% de éter etílico em éter de petróleo. A pureza da solução foi verificada pela CLAE. Os parâmetros usados para confirmar a identidade do padrão foram: ordem de eluição na coluna, coloração do pigmento eluído, tempo de retenção em CLAE e espectro de absorção característico. A quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando o coeficiente de absorvidade de 2592 e comprimento de onda de máxima absorção a 450 nm (Rodriguez-Amaya, 1989). O cálculo do valor de vitamina A foi feito segundo as recomendações do Institute of Medicine (IOM, 2001), em que o Equivalente de Retinol (RE) foi substituído pelo Equivalente de Atividade de Retinol (RAE). Define-se que 1 RAE equivale a 1 μ g de retinol ou 12 μ g β -caroteno.

2.5. Extração de vitamina C e β -caroteno

Para extração da vitamina C cerca de 3 g de amostra foram trituradas em microtriturador por 5 minutos com 15 mL de solução extratora composta por ácido metafosfórico (AMP) 3%, ácido acético 8%, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,3 N e EDTA 1 mM, conforme metodologia otimizada em neste laboratório (dados ainda não publicados). Em seguida a amostra foi filtrada a vácuo, em papel de filtro. O filtrado foi diluído com água até volume de 25 mL e centrifugado por 15 minutos a 0,402 xg (4000 rpm). O sobrenadante foi armazenado a 5 °C até a análise cromatográfica. Salienta-se que as análises por CLAE foram realizadas no mesmo dia da extração.

A extração de β -caroteno foi realizada segundo a metodologia descrita por Rodriguez et al. (1976), com algumas modificações. Para a couve crua cerca de 3g de amostra foram utilizadas para extração do β -caroteno, por meio da trituração com cerca de 70 mL de acetona resfriada. Depois de trituradas na presença de acetona, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 20 minutos, conforme proposto por de Sá & Rodriguez-Amaya (2004). O objetivo foi melhorar a eficiência de extração. O extrato assim obtido foi transferido para 50 mL de éter de petróleo e concentrado em evaporador rotativo, na faixa de temperatura entre 35 e 37 °C. Em seguida, os carotenóides foram dissolvidos novamente em 25 mL de éter de petróleo. Os pigmentos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, em congelador a -5 °C, até a análise dos carotenóides (cerca de 24 horas).

Para extração de β -caroteno da couve refogada cerca de 3 g de amostra foram trituradas com 70 mL de acetona resfriada e, em seguida, o extrato permaneceu por 2 horas em congelador, para solidificação do óleo (de Sá e Rodriguez-Amaya, 2004). Após este período o extrato foi filtrado rapidamente, utilizando funil de vidro previamente resfriado, transferido para o éter de petróleo, concentrado, redissolvido e armazenado conforme descrição feita para as amostras cruas.

Destaca-se que em todas as análises as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial durante todo o processo, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo “blackout”.

2.6. Condições cromatográficas

Foi empregado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, munido de bomba de alta pressão, modelo LC-10AT VP; injetor automático com “loop” de 50 μ l, modelo SIL-10AF; detector de arranjo de diodos UV-visível modelo SPD-M10A; controlado pelo “software” Multi System, Class VP 6.12.

A análise de vitamina C foi realizada conforme proposto por Franke et al (2004), com algumas alterações. Utilizou-se uma coluna Lichospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5 μ m (Merck, Alemanha), fase móvel composta por 1 mM fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e 1 mM EDTA, pH ajustado para 3.0 com ácido fosfórico (H_3PO_4), em eluição isocrática, a um fluxo de 1 ml/min. A detecção foi realizada a 245 nm.

As condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant’Ana et al. (1998), com algumas modificações, foram empregadas para análise do β -caroteno. Foram utilizados os mesmos equipamentos descritos para vitamina C e coluna VP-ODS 150 x 4,6 mm, Shimadzu, fase móvel composta por metanol, acetato de etila, acetonitrila (50:40:10), a um fluxo de 1,0 mL/minuto. A detecção foi feita a 450 nm.

A identificação do AA e β -caroteno nas amostras foi feita pela combinação das informações obtidas utilizando o detector de arranjos de diodo (espectros de absorção, comprimento de onda de máxima absorção), o comportamento cromatográfico e a co-cromatografia com padrões.

Soluções padrão de AA foram preparadas diariamente e a concentração real destas soluções foi calculada segundo a lei de Lambert-Beer, baseando-se na absorvância máxima determinada por espectrofotometria e coeficiente de absorvidade molar. Para AA o coeficiente utilizado foi de 560, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 2,0 (Ball, 1994). Para construção da curva padrão empregada para quantificação do AA utilizou-se injeção de volumes crescentes de solução padrão a 50 $\mu\text{g/mL}$.

A quantificação do padrão de β -caroteno foi realizada conforme já descrito no item 2.4. A curva padrão foi construída pela injeção de volumes crescentes (5 a 50 μL) de uma solução padrão de β -caroteno (1,3 $\mu\text{g/ml}$).

A faixa de linearidade foi testada pela injeção, em duplicata, de volumes crescentes (5 a 50 μL) das soluções padrão de AA e β -caroteno, nas condições cromatográficas já mencionadas. O limite de detecção foi definido como a concentração mínima capaz de gerar uma resposta do detector 3 vezes maior que o ruído da linha de base (Rodriguez-Amaya, 1999).

O teste de recuperação dos padrões foi feito pela adição de 1,0 mg de AA e 20 μg de β -caroteno às amostras, separadamente. As porcentagens de recuperação foram obtidas a partir das diferenças percentuais entre os teores analisados e os adicionados.

2.7. Redução e quantificação do ácido desidroascórbico

A quantificação do DHA foi realizada subtraindo o conteúdo de AA inicial (antes da conversão do DHA) do conteúdo de AA total (após a conversão do DHA a AA). A 1 mL do extrato de couve crua foi adicionado 1 mL de tampão Trizma 0,5 M (pH 9,0) contendo 40 mM de DTT, para obter um pH próximo a 5,5. Após 10 minutos, o processo foi interrompido com a adição de 0,5 mL de H_2SO_4 0,4 M, obtendo um pH final próximo a 2.

Para as amostras de couve refogada 1,5 mL de tampão Trizma contendo 40 mM de DTT foi adicionado a 1 mL do extrato. Para reduzir novamente o pH antes da injeção foi necessário adicionar 1,5 mL de H_2SO_4 , 0,4 M.

Em ambos os casos as amostras foram mantidas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 10 minutos para que se processasse a conversão, sendo a injeção cromatográfica feita imediatamente após.

2.8. Determinação de sólidos totais

As porcentagens de sólidos totais foram determinadas por diferença após determinação do teor de umidade das amostras conforme metodologia descrita por Kawashima e Valente Soares (2003). Cerca de 10 g de couve foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 105 $^\circ\text{C}$ por duas horas.

2.9. Cálculo da retenção

Na etapa 1, em que o tratamento térmico não foi empregado, as porcentagens de retenção de AA, DHA, vitamina C total e β -caroteno foram calculadas de acordo com a equação: $100 - [(\text{conteúdo inicial} - \text{conteúdo final}) / \text{conteúdo inicial}]$

x 100], em que o conteúdo inicial corresponde à amostra controle e conteúdo final às amostras após os tratamentos.

Na etapa 2, para que pudessem ser realizadas comparações entre a quantidade de AA, DHA, vitamina C total e β -caroteno na couve crua e refogada, a porcentagem de retenção real foi calculada de acordo com a técnica proposta por Murphy et al. (1975), utilizando a equação:

$$\% \text{ RR} = \frac{C_p \times P_p}{C_c \times P_c} \times 100;$$

em que % RR é a porcentagem de retenção real, C_p é o conteúdo do nutriente por grama do alimento preparado, P_p é o peso do alimento (em gramas) após o preparo, C_c é o conteúdo do nutriente por grama do alimento cru e P_c é o peso do alimento cru (em gramas).

3. Resultados e discussão

3.1. Sólidos totais

A porcentagem de sólidos totais das amostras de couve variou entre 9,29 % e 12,27 % na etapa 1, com média de 10,68 %. Na etapa 2 as porcentagens estiveram entre 11,50 % e 15,34 %, com média de 12,94 %. Estas porcentagens de sólidos totais estão de acordo com os resultados relatados por Kawashima e Valente Soares (2003), em que a couve apresentou os mais elevados teores de sólidos, em relação a outras hortaliças folhosas.

A determinação de sólidos totais foi realizada na couve antes de cada tratamento para caracterizar as amostras e não foram empregados para cálculo da retenção de nutrientes após a cocção.

3.2. Curvas-padrão e testes de recuperação

As curvas padrão de AA e β -caroteno foram construídas, cada uma, com 5 pontos, obtendo-se boa linearidade. Os coeficientes de correlação foram 0,9994 para AA e 0,9905 para β -caroteno. O limite de detecção foi de 50 $\mu\text{g/L}$ para AA e 46 $\mu\text{g/L}$ para β -caroteno.

Há diferenças na extração de carotenóides de vegetais crus e após cocção. Em geral, a cocção facilita a extração, possivelmente por causa da desnaturação dos complexos carotenóide-proteína e do abrandamento das paredes celulares (de Sá & Rodriguez-Amaya, 2004; Khachick et al., 1992). Para evitar que isto interferisse nos resultados, a técnica utilizada por de Sá & Rodriguez-Amaya (2004) foi empregada. As amostras de couve crua foram sonicadas com acetona, por 20 minutos em vibrador ultrassônico, para favorecer a extração. A média de recuperação de β -caroteno de amostras de couve crua foi de 83 %.

Por outro lado, o método de preparo escolhido incorporou óleo à couve, dificultando a extração de carotenóides. Para evitar a necessidade de saponificação com KOH, que pode levar a perdas indesejáveis, já que os carotenóides são sensíveis a pH alcalino (Oliver & Palou, 2000, Khachick et al., 1986), optou-se por seguir o procedimento descrito por de Sá & Rodriguez-Amaya (2004), que consiste na solidificação do óleo a baixas temperaturas e posterior

isolamento por filtração. A média de recuperação de β -caroteno foi de 82 % em couve refogada.

Houve preocupação também quanto à interferência do óleo na extração de AA da couve refogada. Entretanto, baseado em estudo anterior (dados ainda não publicados) não foi necessária nenhuma alteração quanto ao processo de extração de AA de couve refogada. A recuperação média de AA foi de 90 % para couve crua e 94 % para couve refogada.

Na Figura 1 são apresentados os cromatogramas de AA e de β -caroteno em amostras de couve.

3.3. Teores de AA, DHA, vitamina C total e β -caroteno.

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as médias dos conteúdos de AA, DHA, vitamina C total e β -caroteno nas amostras de couve crua e depois de preparada. Os teores de AA estiveram entre 66,50 e 92,82 mg/100g. O DHA representou entre 8 e 21% do total de vitamina C da couve. Os conteúdos de β -caroteno encontrados estiveram entre 1077,82 e 1661,78 μ g/100g).

Os valores de AA encontrados são da mesma ordem de magnitude dos relatados por outros autores. Pfendt et al. (2003) encontraram conteúdo de AA em couve crua de cerca de 92,6 mg/100g. Em estudo realizado também na cidade de Viçosa, a couve crua apresentou entre 90,2 e 136,4 mg/100g de AA (Rodrigues, 2005).

Outros autores relataram conteúdos mais elevados de AA em couve (186,0 mg/100g) (Davey et al., 2000). Em geral, o teor de vitaminas em alimentos de origem vegetal é bastante variável, ainda que para uma mesma espécie. A revisão feita por Lee & Kader (2000) reporta bem os fatores que influenciam a variação no conteúdo de vitamina C de frutas e hortaliças, como a variedade, as condições climáticas e a forma de cultivo. Muitos dos trabalhos não relatam a variedade utilizada e as condições de produção, o que dificulta a comparação dos dados.

Não foram encontrados outros trabalhos que avaliassem o conteúdo de DHA em couve. Em outras hortaliças do gênero *Brassica* o teor de DHA foi de 5 e 29 % da quantidade total de vitamina C em brócolis e repolho, respectivamente (Kall & Andersen, 1999). Já em outro estudo, não se detectou DHA em repolho e o brócolis apresentou cerca de 8 % do total de vitamina C na forma de DHA (Vanderslice et al., 1990).

Segundo o “United States Department of Agriculture” (USDA, 2004), a couve crua contém cerca de 120,0 mg/100g de vitamina C e 9226,0 μ g/100g de β -caroteno.

Embora se considere que a distribuição qualitativa de carotenóides em hortaliças folhosas seja pouco variável (Azevedo & Rodriguez-Amaya, 2005), quantitativamente estes variam bastante, mesmo para uma mesma espécie. O grau de maturação é um dos fatores que afetam o conteúdo de carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1993). Comparando β -caroteno em folhas de couve jovens e maduras, Azevedo & Rodriguez-Amaya (2005) relataram teores mais elevados nas folhas maduras. Da mesma forma, em alface o conteúdo de β -caroteno é cerca de três vezes maior nas folhas maduras do que em folhas jovens (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987). Embora, no presente estudo se tenha tido o cuidado de escolher folhas de couve caracterizadas como adultas, pode ter havido interferência do grau de maturação nos níveis de β -caroteno encontrados. Além

disso, é sabido que o grau de insolação recebida pela hortaliça pode interferir na carotenogênese. Em estudo realizado com couve minimamente processada, o conteúdo de carotenóides foi maior no verão (Azevedo & Rodriguez-Amaya, 2005). No entanto, há relatos de que no verão o teor de β -caroteno possa ser reduzido em folhosos porque a exposição intensa à luz solar gera fotodegradação de carotenóides, superior à sua síntese (Botelho & Mercadante, 2003). Neste trabalho, a couve foi colhida durante o inverno na etapa 1 e durante a primavera, na etapa 2, estações do ano em que o número de horas de exposição a luz solar é menor do que no verão, o que pode ter contribuído para um menor conteúdo de β -caroteno nas amostras. Além desses fatores, cabe ressaltar ainda que a couve permaneceu em temperatura ambiente por cerca de 12 horas, desde a colheita até o início do experimento. Optou-se por não interferir neste período porque em geral esse é o procedimento usado pelos produtores locais que fornecem hortaliças folhosas (colheita no dia anterior à entrega).

Em estudo realizado em Campinas, a couve de cultivar Manteiga apresentou média (verão e inverno) de 4500,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de β -caroteno, enquanto no cultivar Tronchuda essa média foi de 5900,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1991).

Em couve refogada preparada em restaurantes o conteúdo de β -caroteno relatado foi de 2300,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (de Sá e Rodriguez-Amaya, 2003).

De uma maneira geral, embora o teor de β -caroteno de couve no presente estudo esteja abaixo do relatado por outros autores, o conteúdo médio de AA encontra-se dentro da faixa anteriormente relatada por outros autores e as extrações de AA e de β -caroteno foram realizadas paralelamente a partir de uma mesma amostra.

3.4. Valor nutricional da couve

Dados os conteúdos de vitamina C e β -caroteno encontrados nas amostras de couve, é interessante também avaliar quanto isso representa na prática. Uma porção de 70 g de couve refogada (após armazenamento por 24 horas sob refrigeração, sanitização e fatiamento) pode fornecer cerca de 57,11 mg de vitamina C e 916,87 μg de β -caroteno. O fornecimento de vitamina C corresponde a 63 % da recomendação de vitamina C para um homem adulto (90,0 mg), segundo o Institute of Medicine (IOM, 2000). Quanto ao valor de vitamina A, a porção de 70 g pode fornecer cerca de 76,41 μg de RAE, que correspondem a 8% da recomendação de vitamina A para um homem adulto (IOM, 2001).

3.5. Retenção de vitamina C e carotenóides e seleção de práticas de manipulação

A Tabela 1 apresenta os conteúdos e retenções de AA, DHA, vitamina C e β -caroteno de couve na etapa 1 do experimento. Apesar das variações no conteúdo e retenção dos compostos entre os tratamentos, a maior parte destas variações não foi estatisticamente significativa.

Em relação ao conteúdo e retenção de AA houve interação significativa entre tempo de sanitização e temperatura de armazenamento. Desdobrando-se a interação observou-se que há diferença significativa entre os tempos de sanitização nas amostras armazenadas sob temperatura de refrigeração. Como pode ser visto na Figura 2, em temperatura de refrigeração o conteúdo e a retenção de AA mostraram uma tendência de queda com o aumento do tempo de

sanitização. Para a couve armazenada em temperatura ambiente as diferenças entre os tempos não foram significativas.

Apesar de ter sido sanitizada antes do fatiamento e, portanto, mantida sua estrutura intacta, o excesso de tempo durante a sanitização prejudicou a retenção de AA na couve. Houve redução de 12 % de AA quando o tempo de sanitização ultrapassou em 1 hora o tempo recomendado pelo fabricante do sanitizante usado. A solução clorada tem características oxidantes que podem ter afetado o AA. Além disso, as folhas permaneceram em temperatura ambiente, expostas à luz e em contato com a água durante a sanitização. Moraes et al. (2005) relataram que só a lavagem em água corrente, sem sanitização em solução clorada, resultou em perda de 6 % de AA em folhas de couve.

Houve variação na retenção de DHA em temperatura de refrigeração com o avanço do tempo de sanitização, embora não estatisticamente significativa. Isto sugere que a redução do conteúdo de AA pode ter ocorrido em virtude da oxidação do AA com formação de DHA. Entretanto, é possível que a grande variabilidade encontrada no conteúdo de DHA tenha mascarado o efeito do tratamento. A retenção de vitamina C, por sua vez, não apresentou diferenças entre os tratamentos.

Observa-se ainda que o conteúdo e retenção de β -caroteno foram mais elevados em temperatura de refrigeração, independentemente do tempo de sanitização. A retenção de β -caroteno em temperatura ambiente foi próxima à retenção de vitamina C (65 %), mas a 10 °C a retenção elevou-se para 85 %, o que mostra que a redução da temperatura no armazenamento teve influência maior sobre o β -caroteno do que sobre a vitamina C.

Na etapa 2, a couve foi armazenada por 24 horas e sanitizada por 15 minutos já que esse foi o tempo que resultou em melhor retenção de AA na etapa 1. Em seguida, a couve foi fatiada, refogada e exposta à temperatura ambiente por períodos diferentes.

Não houve interação significativa entre temperatura de armazenamento, tipo de corte e tempo de exposição para nenhum dos compostos em estudo.

Na Tabela 2 observa-se que, independentemente do tipo de corte e do tempo de exposição, o conteúdo de AA foi maior em temperatura ambiente, enquanto o conteúdo de β -caroteno foi maior em temperatura de refrigeração. Essa variação pode estar mais associada a diferenças no conteúdo inicial do que propriamente ao tratamento empregado, visto que para as retenções de AA e β -caroteno não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados apresentados na Tabela 3 correspondem às médias dos tratamentos independentemente da temperatura de armazenamento. Como pode ser visto na Figura 3, o conteúdo e retenção de AA reduziram-se com o aumento do tempo de exposição da couve após o preparo, independente da temperatura de armazenamento e do tipo de corte.

Favel (1998) encontrou retenção de cerca de 60 % de vitamina C em brócolis armazenado em temperatura de 20 °C por 3 dias. Já em espinafre a retenção foi muito menor após o mesmo período, apenas 10%, enquanto que o armazenamento por 3 dias a 4 °C resultou em retenção de 100 % em brócolis e 60% em espinafre. Neste trabalho não houve diferença quanto à retenção de vitamina C empregando armazenamento a 10 ou 23 °C (retenção média de 70 %), mas cabe considerar que o tempo de armazenamento usado foi menor (24 horas).

Em temperatura ambiente as folhas não suportariam mais do que 24 horas por causa da perda de água e alterações na cor, causando rejeição no consumo da hortaliça.

Barry-Ryan & O'Beirne (1999) relataram maior retenção de vitamina C em alface rasgada do que em alface fatiada com faca após 24 horas de armazenamento (amostras embaladas e armazenadas a 8 °C).

Embora a couve rasgada tenha apresentado maiores retenções de AA do que a couve fatiada, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Para o método de cocção e tempo de exposição empregados neste estudo, a maior superfície de contato das amostras fatiadas em tiras não influenciou significativamente a retenção de vitamina C e β -caroteno.

Ao contrário, o tempo de exposição após o preparo teve influência significativa sobre a retenção de AA. A maior parte das pesquisas sobre a influência da cocção sobre a vitamina C ou os carotenos em alimentos analisou a retenção logo após a cocção, o que dificulta a comparação dos resultados. É importante considerar a extensão das perdas no período entre o preparo e consumo, pois perdas consideráveis podem ocorrer. Por exemplo, em muitos restaurantes, especialmente os do tipo "self-service", a couve permanece em temperatura ambiente durante o período entre o preparo e o consumo, por tempo até superior a 60 minutos.

Em estudo realizado em restaurantes comercial e institucional, a perda de AA em couve servida crua foi maior durante a distribuição no restaurante comercial (18 %), quando a couve fatiada em tiras permaneceu em temperatura ambiente por cerca de 1 hora. No restaurante institucional, em que a couve crua fatiada foi armazenada por até 2 horas entre 5 e 8 °C, as perdas foram muito menores (4 %) (Moraes et al., 2005).

Durante a cocção pode ocorrer perda de umidade e conseqüente concentração de sólidos na amostra. Por outro lado a forma de preparo escolhida neste estudo (refogado) aumenta o conteúdo lipídico da amostra. Para contornar este problema e poder comparar o conteúdo de nutrientes da amostra crua e da amostra refogada calculou-se a retenção real segundo a equação proposta por Murphy et al. (1975), que permite compensar as alterações de peso ocorridas durante a cocção. A retenção real média de vitamina C após a cocção foi de 80 % e de 91 % para β -caroteno.

Retenções de β -caroteno semelhantes foram relatadas por outros autores em relação à couve refogada (entre 93 e 96%, segundo de Sá e Rodriguez-Amaya, 2004). Speek et al (1988) relataram retenção de apenas 24 % de β -caroteno em couve chinesa refogada por 4 minutos; no entanto, os autores não relataram medidas para compensar as variações de peso após preparo.

Quanto à retenção de vitamina C, não foram encontrados trabalhos com couve refogada. Oteng-Gyang & Mbachu (1987), analisando AA em hortaliças folhosas comuns na Nigéria, relataram retenção média de 70 % após 5 minutos de cocção em água. Em estudo mais recente, também utilizando hortaliças folhosas comumente consumidas na Nigéria, foram encontradas retenções entre 18 e 53 % após 5 minutos de cocção (Oboh, 2005). Esses resultados estão de acordo com a observação de que, por ser um método de preparo rápido, refogar as hortaliças provocaria menores perdas de vitaminas do que cozinhar em água, especialmente

para vitaminas hidrossolúveis, que podem ser perdidas tanto por causa do aquecimento quanto por lixiviação.

De acordo com os resultados encontrados recomenda-se o armazenamento da couve sob refrigeração e controle do tempo de sanitização, não excedendo o tempo necessário para a ação do agente sanificante, conforme recomendado pelo fabricante do produto a ser utilizado. É comum em restaurantes e outras unidades de alimentação coletiva a não observância dessa recomendação, permanecendo as hortaliças por longos períodos em contato com a água. Outra observação importante é realizar a sanitização antes do fatiamento da hortaliça. Embora não tenha sido avaliado neste estudo, possivelmente as perdas seriam maiores se a sanitização fosse realizada após o fatiamento uma vez que a superfície de contato com a água seria maior e o tecido estaria rompido.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as formas de fatiamento (tiras finas ou rasgada), apesar da maior superfície de exposição ao oxigênio e luz das amostras em tiras. No entanto, em ambos os casos houve aumento das perdas com o aumento do tempo de exposição após a cocção. Isso indica que independentemente do corte usado, o melhor é consumir o alimento o mais rapidamente possível. Essa recomendação está sendo feita considerando o valor nutricional, mas também abrange a segurança microbiológica, já que as amostras ficaram expostas em temperatura ambiente.

4. Conclusões

Este trabalho confirma a importância da couve como fonte de vitamina C e β -caroteno, com o fornecimento de cerca de 57,11 mg de vitamina C e 916,87 μ g de β -caroteno a cada porção de 70 g de couve refogada.

O armazenamento sob refrigeração mostrou-se o mais adequado. As hortaliças folhosas são extremamente sensíveis à perda de água e mesmo o armazenamento por curto período (24 horas), em temperatura ambiente, reduziu a retenção de β -caroteno.

Quanto à sanitização, o critério de tempo selecionado foi de 15 minutos, tempo em que as perdas de AA foram menores e indicado para segurança sanitária.

O tempo de exposição após a cocção influenciou negativamente a retenção de AA tanto em couve fatiada em tiras, quanto em couve rasgada. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as formas de fatiamento. Refogar em óleo por poucos minutos é uma forma comum de preparo de hortaliças folhosas, que preserva bem a vitamina C (cerca de 80 % de retenção) e o β -caroteno (91 % de retenção), sendo entretanto, melhor que o consumo seja feito tão logo a preparação esteja pronta.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências Bibliográficas

- (1) Azevedo CH, & Rodriguez-Amaya, DB. 2005. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:591–597.
- (2) Ball GFM. 1994. *Water-soluble vitamin assays in human nutrition*. London: Chapman & Hall. p 416.
- (3) Barry-Rayan C; O'beirne D. 1999. Ascorbic acid retention in shredded iceberg lettuce as affected by minimal processing. *Journal of Food Science* 64(3):498-500.
- (4) Botelho RBA, & Mercadante AZ. 2003. Influência de cultivar /variedade e efeitos geográficos na composição de carotenóides em alimentos – uma revisão. *Boletim SBCTA* 37(supl.):29-34.
- (5) Combs GFJr. 1998. *The Vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health*. 2th ed. New York: Academic Press.
- (6) Davey MW, Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, & Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:825–860.
- (7) de Sá MC & Rodriguez-Amaya DB. 2003. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *Food Chemistry* 83:595–600.
- (8) de Sá MC. & Rodriguez-Amaya DB. 2004. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – Comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis* 17:37-51.
- (9) Favel DJ. 1998. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry* 62(1):59-64.
- (10) Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, Murphy SP. 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 17:1–35.
- (11) Godoy HT, & Rodriguez-Amaya DB. 1998. Occurrence of Cis Isomers of Provitamins A in Brazilian Vegetables. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 46:3081-3086.
- (12) IOM - U. S. Institute of Medicine. 2001. Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary Reference Intakes: for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington: National Academy Press.
- (13) IOM - U. S. Institute of Medicine. 2000. Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington: National Academy Press.
- (14) Kall MA, & Andersen C. 1999. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography A* 730:101–711.
- (15) Kawashima LM, & Valente Soares LM. 2003. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis* 16:605–611

- (16) Khachik F, Beecher GR, & Whitaker NF. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 34:603-616.
- (17) Khachik F, Goli MB, Beecher GR, Holden J, Lusby WK, Tenorio MD, & Barrera MR. 1992. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40:390-398.
- (18) Khaw KT, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, Day N. 2001. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *Lancet* 357:657–63.
- (19) Kurl S, Tuomainen TP, Laukkanen JA, Nyssönen K, Lakka T, Sivenius J, Salonen JT. 2002. Plasma vitamin C modifies the association between hypertension and risk of stroke. *Stroke* 33:1568–1573.
- (20) Lampe J. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 70(3):475S–490S.
- (21) Lee SK, Kader AA. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology Technology* 20:207-220.
- (22) Liu RH. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 517–520.
- (23) Mahan LK & Escott-Stump S. 2005. Vitaminas. In: Mahan LK & Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11^a ed. São Paulo: Rocca. p 77-122.
- (24) Mercadante AZ, Rodriguez-Amaya DB. 1991. Carotenoid Composition of a Leafy Vegetable in Relation to Some Agricultural Variables. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 39:1094-1097.
- (25) Moraes, F. A., Cota A. M., Pinheiro-Sant'Ana H. M., Campos, F. M, Rodrigues, C. M. A. (2005). Perdas de vitamina C em hortaliças durante o armazenamento, preparo e distribuição em restaurantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (submetido).
- (26) Moreira APB, Pinheiro-Sant'Ana HM, Souza SL, Alencar ER. 2005. Atividade Provitamínica A de Hortaliças Comercializadas no Mercado Formal e Informal de Viçosa, MG. *Revista Ceres* 52(300):179-190.
- (27) Murphy EW, Criner PE, Gray BC. 1975. Comparison of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:1153 –1157.
- (28) Oboh G. 2005. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 38:513–517.
- (29) Oliver J & Palou A. 2005. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A* 881:543–555.
- (30) Oteng-Gyang K, Mbachu JI. 1987. Changes in the ascorbic acid content of some tropical leafy vegetables during traditional cooking and local processing. *Food Chemistry* 23:9-17.

- (31) Pfendt LB, Vukasinovic VL, Blagojevic' NZ, & Radojevic' MP. 2003. Second order derivative spectrophotometric method for determination of vitamin C content in fruits, vegetables and fruit juices. *European Food Research and Technology* 217(3):269–272.
- (32) Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. 1998. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry* 61(1-2):145-151.
- (33) Ramalho RA, Flores H, Saunders C. 2002. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Saúde Pública* 34(1):56-63.
- (34) Ramos DMR, & Rodriguez-Amaya DB. 1987. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. *Journal of Micronutrient Analysis* 3:147-155.
- (35) Rios MDG, & Penteado MVC. Vitamina C. In: Penteado, M. V. C. 2003. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1ª ed. São Paulo: Manole. p 201-225.
- (36) Rodrigues CMA. 2005. Avaliação e controle de perdas de vitamina C em hortaliças preparadas em restaurante comercial e institucional [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. 99p.
- (37) Rodrigues CMA, Pinheiro-Sant'Ana HM. 2003. É possível prevenir perdas de vitaminas em alimentos? *Nutrição em Pauta* XI(63):12-18.
- (38) Rodriguez DB, Raymundo LC, Lee T, Simpson KL, Chichester CO. 1976. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annual Botanic* 40:615-624.
- (39) Rodriguez-Amaya DB. 1989. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis* 5:191-225.
- (40) Rodriguez-Amaya DB. 1993. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous F. (Ed.), *Shelf life of foods and beverages – chemical biological, physical and nutritional aspects*. Amsterdam: Elsevier Science. p 547-589.
- (41) Rodriguez-Amaya DB. 1997. *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods*. Washington: OMNI. 93 p.
- (42) Rodriguez-Amaya DB. 1999. *A guide for carotenoids analysis in foods*. Washington: International Life Sciences Institute Press.
- (43) SAS Institute Inc. (1994). *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc. 846p.
- (44) Souza WA, Vilas Boas OMGC. 2002. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. *Revista Panamericana de Salud Publica* 12(3):173-179.
- (45) Speek AJ, Speek-Saichua S, Schreurs WHP. 1988. Total carotenoid and β -carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chemistry* 27:245-257.
- (46) Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58:100–110.
- (47) USDA United States Department of Agriculture. 2004. *USDA National Nutrient Database for standard reference*. Release 17. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

- (48) Vanderslice JT, Higgs DJ, Hayes JM, Block G. 1990. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods-as eaten. *Journal of Food Composition and Analysis*. 3:105–118.

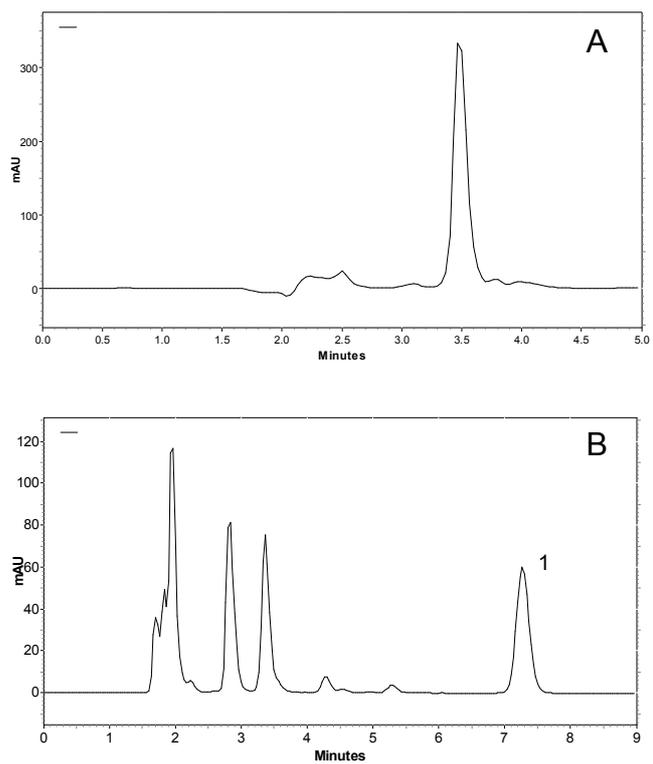


Figura 1. Análise por CLAE de ácido ascórbico em couve controle (A) e β -caroteno (1) em couve refogada (B). Condições cromatográficas descritas no texto.

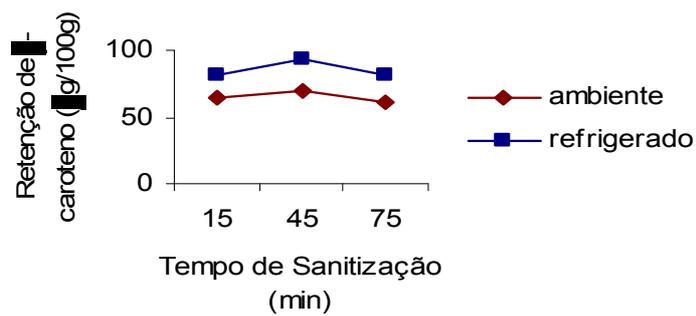
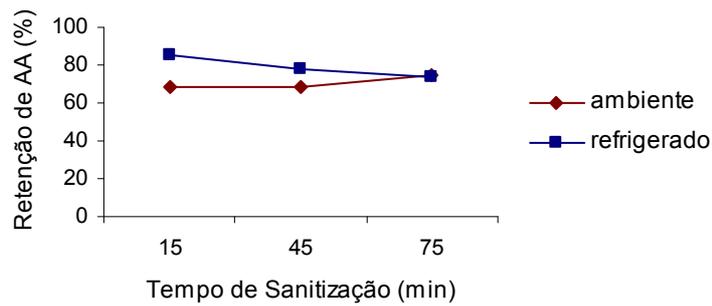
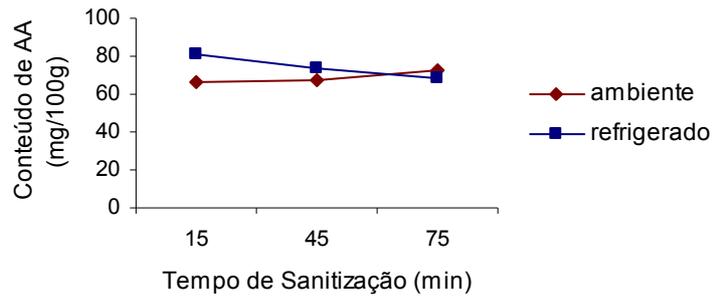


Figura 2. Conteúdo e retenção de ácido ascórbico (AA) e retenção de β -caroteno em couve após armazenamento por 24 horas e sanitização.

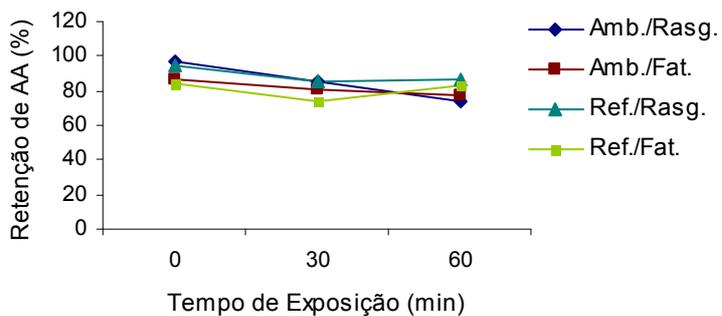
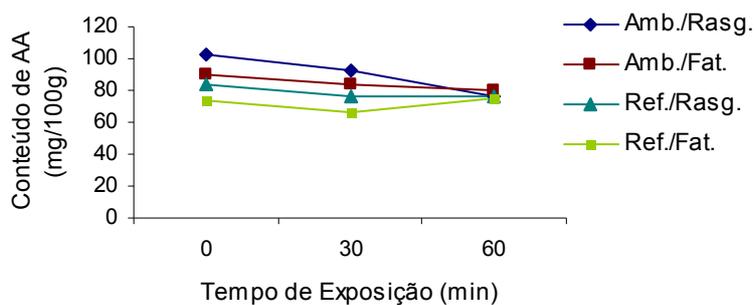


Figura 3. Conteúdo e retenção real de ácido ascórbico (AA) em couve após armazenamento por 24 horas, sanitização, fatiamento e exposição. Amb./Rasg.: temperatura ambiente (24 °C) e corte em pedaços. Amb./Fat.: temperatura ambiente (24 °C) e corte em tiras. Ref./Rasg.: temperatura de refrigeração (10 °C) e corte em pedaços. Ref./Fat.: temperatura de refrigeração (10 °C) e corte em tiras.

Tabela 1. Conteúdo, retenção e análise de variância de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C, β -caroteno de couve após 24 horas de armazenamento e sanitização. ^a

Temperatura ^b	Ambiente						Refrigerado			Fonte de variação ^d		
	Tempo	Controle ^c	15 min	45 min	75 min	15 min	45 min	75 min	TA	Erro a ^e	TS	Erro b ^e
AA (mg/100g)		92,82 \pm 16,09	66,50 \pm 3,22	67,52 \pm 6,01	72,45 \pm 2,54	81,20 \pm 13,51	74,01 \pm 14,10	68,65 \pm 4,07	NS	177,94	NS	23,76
Retenção AA (%) ^f			68,05 \pm 9,52	68,85 \pm 8,18	74,77 \pm 15,91	85,44 \pm 0,93	77,63 \pm 1,67	73,31 \pm 10,12	NS	201,22	NS	28,58
DHA (mg/100g) ^g		24,79 \pm 5,89	19,33 \pm 5,67	13,91 \pm 5,70	11,59 \pm 4,13	7,30 \pm 6,05	15,14 \pm 4,07	14,74 \pm 4,41	NS	7,39	NS	34,87
Retenção DHA (%) ^f			73,11 \pm 14,88	57,12 \pm 30,31	42,98 \pm 7,75	32,61 \pm 27,08	63,07 \pm 28,17	58,63 \pm 15,99	NS	619,51	NS	436,06
Vit C (mg/100g)		117,61 \pm 19,45	85,83 \pm 8,36	81,43 \pm 7,32	84,04 \pm 2,31	88,50 \pm 8,81	89,15 \pm 16,48	83,40 \pm 8,41	NS	190,492	NS	41,94
Retenção Vit C (%) ^f			68,74 \pm 4,88	66,02 \pm 12,80	68,12 \pm 12,53	74,08 \pm 6,88	73,87 \pm 5,57	69,71 \pm 4,85	NS	168,69	NS	27,30
β -caroteno (μ g/100g)		1661,78 \pm 89,15	1150,11 \pm 135,36	1239,92 \pm 140,91	1077,82 \pm 223,24	1377,13 \pm 246,37	1591,11 \pm 72,77	1398,99 \pm 159,44	P<0,05	47190,13	NS	21262,19
Retenção β - caroteno (%) ^f			64,62 \pm 5,81	70,15 \pm 11,95	60,61 \pm 11,81	80,87 \pm 13,45	93,46 \pm 1,62	82,00 \pm 5,77	P<0,05	123,24	NS	71,58

^a Média de 3 repetições \pm desvio-padrão. ^b Temperatura de armazenamento: ambiente (23 °C), refrigerado (10 °C). ^c Controle: não sofreu armazenamento e sanitização. ^d Probabilidade: NS: não significativo; P<0,05: significativo com α = 5% pela análise de variância. TA = temperatura de armazenamento. TS = tempo de sanitização. ^e Quadrado médio. ^f Retenção = 100 – [(controle – tratamento) / controle x 100]. ^g DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) – AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

Tabela 2. Conteúdo, retenção real e análise de variância de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C e β -caroteno de couve após 24 horas de armazenamento, fatiamento e preparo. ^{ab}

Nutriente	Temperatura ambiente ^c	Temperatura refrigeração ^c
AA (mg/100g)	87,65 \pm 17,25 a	75,34 \pm 14,09 b
Retenção de AA (%) ^d	83,33 \pm 16,18 a	84,43 \pm 12,99 a
DHA (mg/100g) ^e	9,31 \pm 4,85 a	9,78 \pm 4,78 a
Retenção de DHA (%) ^d	37,14 \pm 20,02 a	48,98 \pm 25,17 a
Vitamina C (mg/100g)	85,90 \pm 15,04 a	79,72 \pm 13,98 a
Retenção de Vitamina C (%) ^d	74,34 \pm 13,53 a	78,78 \pm 13,42 a
β -caroteno (μ g/100g)	1200,79 \pm 153,93 b	1418,84 \pm 234,23 a
Retenção de β -caroteno (%) ^d	90,33 \pm 8,84 a	89,86 \pm 8,65 a

^a Média de 30 observações \pm desvio-padrão. ^b Amostras armazenadas por 24 horas, sanitizadas por 15 minutos, fatiadas em tiras ou rasgadas, refogadas e expostas a temperatura ambiente por 0, 30 ou 60 minutos. ^c Temperatura de armazenamento: ambiente (23 °C), refrigeração (10 °C). Análise de variância: médias seguidas pela mesma letra, na linha, não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$). ^d Retenção = (conteúdo do nutriente por grama de alimento preparado x peso do alimentos preparado / conteúdo do nutriente por grama do alimento cru x peso do alimento cru) x 100. ^e DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) – AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

Tabela 3. Conteúdo, retenção real e análise de variância de ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (DHA), vitamina C, licopeno e β -caroteno em couve fatiada após diferentes tempos de exposição.^{ab}

Corte	Rasgada				Fatiada			Fonte de Variação ^e				
	Controle ^d	0 minutos ^c	30 minutos	60 minutos	0 minutos ^c	30 minutos	60 minutos	TA	TC	Erro a ^f	TE	Erro b ^f
AA (mg/100g)	93,48 \pm 16,73	91,06 \pm 14,59	84,19 \pm 13,94	76,66 \pm 19,32	82,05 \pm 14,83	75,03 \pm 14,53	77,54 \pm 12,24	P<0,05	NS	466,55	P<0,05	121,46
Retenção de AA (%) ^g		95,54 \pm 12,58	85,70 \pm 9,19	80,03 \pm 21,27	85,00 \pm 15,51	76,86 \pm 9,38	80,14 \pm 7,00	NS	NS	379,02	P<0,01	113,98
DHA (mg/100g) ^h	21,52 \pm 4,21	7,24 \pm 4,54	9,50 \pm 5,83	10,67 \pm 4,06	8,78 \pm 6,53	10,49 \pm 4,02	10,59 \pm 3,37	NS	NS	33,22	NS	20,41
Retenção de DHA (%) ^g		32,09 \pm 19,52	43,31 \pm 27,21	47,15 \pm 19,16	40,30 \pm 31,72	46,68 \pm 13,82	48,84 \pm 19,11	NS	NS	877,99	NS	386,28
Vitamina C (mg/100g)	101,52 \pm 14,24	91,07 \pm 14,61	85,29 \pm 12,41	79,59 \pm 17,18	82,49 \pm 16,22	77,43 \pm 15,15	81,01 \pm 11,58	NS	NS	365,77	NS	149,03
Retenção de Vitamina C (%) ^g		82,85 \pm 10,24	78,50 \pm 14,26	74,38 \pm 20,17	77,24 \pm 17,63	71,17 \pm 7,62	75,24 \pm 7,27	NS	NS	343,96	NS	122,05
β -caroteno (μ g/100g)	1355,08 \pm 215,70	1324,06 \pm 211,80	1301,13 \pm 222,90	1290,99 \pm 263,77	1315,26 \pm 180,18	1302,22 \pm 193,48	1325,23 \pm 165,31	P<0,05	NS	117495,95	NS	10686,52
Retenção de β -caroteno (%) ^g		90,37 \pm 9,25	88,64 \pm 9,24	87,81 \pm 11,74	91,47 \pm 4,52	90,11 \pm 8,00	92,17 \pm 7,93	NS	NS	135,19	NS	55,40

^a Média de 10 observações \pm desvio-padrão. ^b Amostras armazenadas por 24 horas, sanitizadas por 15 minutos, fatiadas em tiras ou rasgadas, refogadas e expostas a temperatura ambiente por 0, 30 ou 60 minutos. ^c Tempo de exposição à temperatura ambiente (23 °C). ^d Controle: não sofreu armazenamento, sanitização, fatiamento e cocção. ^e Probabilidade: NS: não significativo; P<0,05: significativo com $\alpha=5\%$; P<0,01: significativo com $\alpha=1\%$ pela análise de variância. TA = temperatura de armazenamento. TC = tipo de corte. TE = tempo de exposição. ^f Quadrado médio. ^g Retenção = (conteúdo do nutriente por grama de alimento preparado x peso do alimentos preparado / conteúdo do nutriente por grama do alimento cru x peso do alimento cru) x 100. ^h DHA = Vitamina C total (após redução do DHA pelo DTT) – AA (conteúdo de AA antes da redução do DHA pelo DTT).

5. CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia otimizada para análise de ácido ascórbico, ácido desidroascórbico e vitamina C total pode ser empregada com sucesso em couve e tomate, pode ser utilizada para análise de vitamina C mesmo em couve adicionada de óleo, como no caso da couve refogada.

O conteúdo de ácido ascórbico foi em média de 17 mg/100g e 12 mg/100g em tomate antes e após a manipulação, respectivamente. Os valores médios foram de 93 mg/100g em couve crua e 77 mg/100g em couve refogada. Os teores de ácido desidroascórbico foram bastante variáveis tanto em tomate quanto em couve. As médias foram de 3 mg/100g em tomate após o preparo, 23 mg/100g em couve crua e 11 mg/100g em couve refogada.

O conteúdo médio de β -caroteno em tomate foi de 160 μ g/100g, após o preparo. Já a couve apresentou maiores quantidades de β -caroteno. A couve crua teve média de 1508 μ g/100g, enquanto a couve refogada apresentou média de 1308 μ g/100g.

Em tomates o teor médio de licopeno foi de 5123 μ g/100g antes do preparo e 3663 μ g/100g após o preparo.

Uma porção de 70 g de couve refogada pode fornecer cerca de 60 mg de vitamina C e 921 μ g de β -caroteno, enquanto uma porção de 60 g de tomate pode fornecer cerca de 9 mg de vitamina C, 96 μ g de β -caroteno e 2964 μ g de licopeno.

No armazenamento, pré-preparo e preparo tanto de couve quanto de tomate ocorreram perdas de vitamina C e carotenóides. As condições que proporcionaram melhor retenção destes compostos foram o armazenamento sob refrigeração tanto para períodos curtos (24 horas) quanto para períodos mais longos (72 horas), desde que os tomates sejam armazenados depois de maduros.

A sanitização em solução clorada por 15 minutos foi a prática selecionada por ser considerada suficiente para controle microbiológico e por evitar perdas desnecessárias de ácido ascórbico da couve sanitizada por períodos mais longos.

Não houve evidências de que os tipos de corte utilizados em tomate e couve interferissem em eventuais perdas de vitamina C e carotenóides.

Apesar do tempo de exposição não ter afetado significativamente a retenção da vitamina C e dos carotenóides em tomates, para couve houve influência negativa do tempo. O período de exposição após a cocção reduziu a retenção de ácido ascórbico tanto em couve fatiada em tiras quanto em couve rasgada. Por isso recomenda-se que as hortaliças sejam preparadas o mais próximo possível do horário de consumo.

As práticas de manipulação selecionadas para melhor preservação de vitamina C e carotenóides em couve e tomate:

- Armazenamento sob refrigeração para couve e tomates maduros;
- Controle do tempo de sanitização, empregando-se 15 minutos;
- Controle do tempo de exposição após o fatiamento e preparo. Planejar o preparo das hortaliças de forma que o tempo entre o preparo e o consumo seja o menor possível.

Sugere-se que outros estudos desta natureza sejam realizados com outras hortaliças e outras formas de preparo. E, ainda, que as práticas de manipulação selecionadas neste trabalho sejam testadas em Unidades de Alimentação e Nutrição, em situações reais de produção de alimentos.