

MICHELE GUINAZI

**TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS EM HORTALIÇAS, OVOS
E ÓLEOS VEGETAIS UTILIZADOS EM RESTAURANTES
COMERCIAIS**

Tese 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
2004

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

T

G964t
2004

Guinazi, Michele, 1979-

Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais / Michele Guinazi. – Viçosa : UFV, 2004.

xvi, 90f. : il. ; 29cm.

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

Referências bibliográficas: f. 83-90

1. Alimentos - Teor vitamínico. 2. Alimentos - Composição. 3. Vitamina E. 4. Vitamina E na nutrição humana. 5. Vitamina E - Estabilidade. 6. Cromatografia a líquido de alta eficiência. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 664.07

MICHELE GUINAZI

TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS EM HORTALIÇAS, OVOS E ÓLEOS
VEGETAIS UTILIZADOS EM RESTAURANTES COMERCIAIS

Tese 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: 30 de abril de 2004.

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Conselheiro)

Prof^a. Maria do Carmo Gouveia Pelúzio
(Conselheira)

Prof^a. Helena Teixeira Godoy

Prof^a. Ângela Maria Campos Santana

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

Aos meus pais Airton e Zélia, meus grandes incentivadores, por todo amor,
apoio e orientação.

Ao meu avô Giocondo, por ter sido exemplo de honestidade e coragem. E pelo carinho que me destinou, até o fim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir viver e crer que “posso todas as coisas, pois Ele me fortalece - *Fp 4:13*”.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização desse curso.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^a Helena Maria Pinheiro Sant’Ana, pela competência, paciência e pelo exemplo de profissionalismo. Palavras seriam insuficientes para agradecer a orientação sempre presente, o incentivo durante toda a realização deste curso e a amizade.

Agradeço ao Prof. Sebastião César Cardoso Brandão, pela prontidão em me ajudar com os métodos e o cromatógrafo, pela correção da tese e pelas sugestões.

À Prof^a Maria do Carmo Pelúzio e Prof^a Josefina Bressan Resende Monteiro, pela colaboração e atenção.

Aos demais membros da banca, Prof^{as}. Helena Teixeira Godoy e Ângela Maria Campos Santana, pelas valiosas sugestões e correção da tese.

Ao Prof. José Benício Paes Chaves, pela realização da análise estatística dos dados e auxílio para o meu entendimento dos resultados. Agradeço a gentileza e a prontidão com que me ajudou sempre que necessário.

A todos os professores e funcionários do DNS, que me acompanharam durante a graduação e continuaram torcendo durante esta etapa.

Em especial, agradeço ao Ricardo Antonucci, pela paciência incansável em me orientar no laboratório e pelos inúmeros favores gentilmente prestados.

À Solange, pelo apoio imprescindível em minha rotina acadêmica, sem o qual, com certeza, não estaria alcançando esta etapa.

Ao Thomás, funcionário do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela prontidão em me ajudar com a manutenção dos equipamentos do laboratório.

À Marina Maria Silva, pela contribuição inestimável nas atividades do laboratório. Nunca serei suficientemente grata pela ajuda que me permitiu concluir esse trabalho.

Agradeço ao Lúcio Sant'Ana, pela gentil colaboração que foi essencial na finalização da tese. Ao Anderson, pela paciência e cuidado na edição dos cromatogramas.

Aos meus colegas de mestrado, pelo incentivo e convivência diária. Alegro-me em saber que juntos colaboramos para tornar este Programa cada vez mais sólido.

Aos meus irmãos, Irlane e Tiago, pelas tantas brincadeiras que me ajudaram a superar a saudade.

Às minhas grandes amigas Carina, Míriam e Tathi, por tanto interesse e torcida. Agradeço pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis, pela convivência e pelos momentos de descontração. Essa vitória também é de vocês.

Agradeço especialmente à querida amiga Denise Bolelli, por tanto e total apoio, mesmo passando por tanto sofrimento imposto pelo câncer. A ela agradeço o companheirismo, alegria, otimismo e até mesmo as dificuldades compartilhadas nesta etapa de nossas vidas.

Aos meus amigos Túlio, Ricardo Furst e Bárbara, pelo carinho e amizade. A Adelaine, pelo presente da convivência nesses últimos dias de Viçosa.

Ao meu amigo Carlos Roberto Lima, por tornar muitos dos meus dias mais felizes.

À Helen Hermana, amiga e companheira de graduação e mestrado, por tantas risadas em meio à correria.

À Claudinha, Marina, Pollyanna, Ana Paula, Samara e Flávia, companheiras nos estudos e trabalhos sobre vitaminas. Agradeço o interesse e ajuda durante as minhas dúvidas no laboratório.

Aos proprietários e funcionários dos restaurantes comerciais que participaram desse estudo, pela colaboração e prontidão para a coleta das amostras.

Ao Chicão, por tantas águas e cafezinhos, e pelo carinho.

A todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

À FAPEMIG, pelo financiamento deste projeto de pesquisa. À CAPES, pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Michele Guinazi, filha de Airton Guinazi e Zélia Gueler Guinazi, nasceu em 20 de março de 1979, em Linhares, Espírito Santo.

Ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em maio de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, nível mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Características Gerais da Vitamina E	5
3.1.1. Mecanismos de Absorção, Transporte e Metabolismo	8
3.1.2. Biodisponibilidade e Atividade Biológica de Tocoferóis e Tocotrienóis	9
3.1.3. Recomendações Nutricionais para Vitamina E	12
3.2. Funções da Vitamina E	14
3.2.1. Função Antioxidante	14
3.2.2. Papéis Não-Antioxidantes	18
3.3. Ocorrência de Vitamina E nos Alimentos	19
3.4. Metodologia para Determinação de Tocoferóis e Tocotrienóis em Alimentos	22
3.5. Importância de Estudos sobre Valor Nutritivo e Estabilidade de Nutrientes em Unidades de Alimentação e Nutrição	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Materiais	30
4.1.1. Matéria-Prima	30
4.1.2. Reagentes e Outros Materiais	30
4.1.3. Equipamentos	31
4.2. Métodos	31
4.2.1. Restaurantes Colaboradores	31
4.2.2. Condições de Preparação e Coleta dos Alimentos	32
4.2.3. Determinação das Condições de Extração dos Compostos Vitamínicos	35
4.2.4. Determinação das Condições Cromatográficas	35

4.2.5. Otimização do Método de Preparo das Amostras e das Condições de Análise por CLAE	36
4.2.5.1. Extração dos Compostos Vitamínicos	36
4.2.5.2. Preparo dos Padrões Vitamínicos	37
4.2.5.3. Determinação dos Compostos Vitamínicos	39
4.2.5.4. Determinação da Faixa de Linearidade	42
4.2.5.5. Análise da Recuperação dos Padrões	42
4.2.5.6. Análise Estatística dos Resultados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Otimização do Método de Extração dos Compostos Vitamínicos	44
5.2. Determinação da Pureza dos Padrões	45
5.3. Otimização das Condições Cromatográficas	46
5.4. Análise Qualitativa da Vitamina E	48
5.5. Análises Cromatográficas Quantitativas	61
5.5.1. Curvas-Padrão para Determinação de Tocoferóis e Tocotrienóis	61
5.5.2. Faixa de Linearidade	62
5.5.3. Recuperação dos Padrões	63
5.5.4. Determinação dos Compostos nas Amostras	64
6. CONCLUSÕES	80
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Atividade de vitamina E de tocoferóis e tocotrienóis	11
2. Recomendações nutricionais de vitamina E para indivíduos saudáveis de diferentes estágios de vida	14
3. Condições de armazenamento e higienização de hortaliças e ovos nos restaurantes comerciais colaboradores	33
4. Condições de preparo e higienização de hortaliças e ovos nos restaurantes comerciais colaboradores	34
5. Condições de extração avaliadas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE	36
6. Coeficientes de absorvidade molar específicos e comprimentos de onda máximos para tocoferóis em solução de etanol a 96%	39
7. Condições cromatográficas testadas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças e ovos por CLAE.....	40
8. Análise de variância do teor vitamínico de hortaliças e ovos utilizados em restaurantes comerciais	43
9. Avaliação das condições de extração para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE	44
10. Comprimento de onda máximo, absorvância e pureza dos padrões de tocoferóis e tocotrienóis em solução de etanol a 96%	45
11. Concentração reais dos padrões utilizados para quantificação dos compostos vitamínicos, corrigidos segundo a pureza	46
12. Avaliação das condições cromatográficas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE	47
13. Faixa linear obtida para tocoferóis e tocotrienóis determinados por CLAE	63
14. Recuperação de padrões de tocoferóis e tocotrienóis em amostras cruas de agrião, pimentão, rúcula e salsa	63
15. Teores (média \pm desvio padrão) de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças cruas preparadas em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida)	65

16. Teores (média \pm desvio padrão) de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças cruas e cozidas/refogadas e ovos crus e cozidos preparados em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida)	66
17. Teores (média \pm desvio padrão) de tocoferóis e tocotrienóis para hortaliças folhosas preparadas em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida)	72
18. Teores (média \pm desvio padrão) de tocoferóis e tocotrienóis para hortaliças utilizadas como temperos em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida)	73
19. Teores (média \pm desvio padrão) de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Compostos naturais da vitamina E	6
2. Oxidação e reações antioxidantes envolvendo a vitamina E	16
3. Separação de compostos por CLAE de acordo com o coeficiente de resolução	41
4. Análise por CLAE da mistura de padrões de tocoferóis e tocotrienóis	49
5. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de agrião	49
6. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de almeirão cru	50
7. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de almeirão refogado	50
8. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de brócolis cru	51
9. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de brócolis cozido	51
10. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de couve crua	52
11. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de couve refogada	52
12. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de cebolinha	53
13. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de espinafre	53
14. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de pimentão	54
15. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de rúcula	54
16. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de salsa	55
17. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de gema de ovo crua	55

18. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de gema de ovo cozida	56
19. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de couve crua (Corrida completa)	57
20. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de brócolis cru (Corrida completa)	58
21. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de salsa crua (Corrida completa)	58
22. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de óleo de oliva	59
23. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de óleo de canola	60
24. Análise por CLAE de tocoferóis e tocotrienóis em amostra de óleo de soja	60
25. Curvas-padrão para os isômeros tocoferóis (traçadas com valores médios de injeções em triplicata)	61
26. Curvas-padrão para os isômeros tocotrienóis (traçadas com valores médios de injeções em triplicata)	62
27. Adequação à ingestão dietética de referência para vitamina (considerando os teores de α -tocoferol) a partir do consumo de hortaliças e óleos	78

RESUMO

GUINAZI, Michele. M.S. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004.
Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais. Orientadora: Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana. Conselheiros: Sebastião César Cardoso Brandão, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio e Josefina Bressan Resende Monteiro.

O presente trabalho teve por finalidade avaliar a concentração e a distribuição dos isômeros da vitamina E em alimentos, preparações e óleos utilizados rotineiramente em dois restaurantes comerciais. Para isso, foi otimizada uma metodologia para extração e quantificação de tocoferóis e tocotrienóis por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) nas seguintes amostras: agrião, almeirão cru e refogado, brócolis cru e cozido, cebolinha, couve crua e refogada, espinafre, pimentão, rúcula, salsa; gema de ovos crus e cozidos; óleos de canola, oliva e soja. O método empregado para extrair os compostos consistiu em uma extração direta com solvente (isopropanol e hexano:acetato de etila, 85:15, v/v). Para a análise das amostras utilizou-se sistema de fase normal, com fase móvel composta de hexano:isopropanol:ácido acético (99,3;0,6;0,07) e injeções de 5 e 50 μL das amostras, em tempos de corridas médios de 20 minutos. A metodologia otimizada para os alimentos analisados foi considerada simples e rápida, além de preservar os isômeros da vitamina E, quando comparado aos métodos avaliados envolvendo saponificação. Os resultados obtidos demonstram que a composição de tocoferóis e tocotrienóis dos alimentos avaliados variou bastante e, em geral, os isômeros tocoferóis foram detectados em maior quantidade e frequência; β - e δ -tocotrienol foram os compostos menos encontrados. O α -tocoferol foi o composto predominante, com concentrações variando entre 0,1882 a 1,1463 mg/100g em hortaliças cruas; e 12,1401 a 18,3931 mg/100g em óleos vegetais. O teor de vitamina E dos alimentos preparados nos diferentes restaurantes não foi diferente estatisticamente, exceto entre os alimentos crus e cozidos/refogados para alguns compostos. O processo de refogar aumenta a concentração de vitamina E devido à adição de óleo e o cozimento de brócolis e

ovos parecem não ter provocado grandes perdas. Dentre os alimentos avaliados, couve, rúcula, agrião e óleos de soja, canola e azeite, se consumidos nas porções recomendadas, podem contribuir para uma adequação diária de vitamina E na ordem de 7,1 a 13,8%. O estudo contribuiu para a caracterização nutricional dos alimentos em relação à vitamina E, sendo que trabalhos dessa natureza devem ser continuados.

ABSTRACT

GUINAZI, Michele. M.S. Universidade Federal de Viçosa; April, 2004.
Tocopherols and tocotrienols in vegetables, eggs and vegetable oils used in commercial restaurants. Adviser: Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana. Committee members: Sebastião César Cardoso Brandão, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio and Josefina Bressan Resende Monteiro.

The purpose of the present work was to evaluate the concentration and the distribution of the vitamin E isomers in foods, preparations and oils frequently used in two commercial restaurants. For that, a methodology for extraction and quantification of tocopherols and tocotrienols by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) was optimized in the following samples: watercress, wild chicory, broccoli, onion evergreen, spring greens, spinach, sweet pepper, rocket, parsley; egg yolk; canola, olive and soy oils. The employed method to extract the compounds consisted of a direct extraction with solvent (2-propanol and hexane:ethyl acetate, 85:15, v/v). In order to analyse of the samples, a system of normal-phase was used, with a mobile phase composed of acetic hexane: 2-propanol: acetic acid (99,3;0,6;0,07) and injections of 5 and 50 μ L of the samples, in medium elution time of 20 minutes. The methodology optimized for the analyzed foods was considered simple and fast, besides preserving the vitamin E isomers, when compared to the appraised methods involving saponification. The obtained results demonstrate that the tocopherol and tocotrienol composition of the appraised foods varied a lot and, in general, the tocopherols isomers were detected in larger amount and frequency; β - and δ -tocotrienols were the compounds less found. The α -tocopherol was the predominant compound, with concentrations varying between 0,1882 to 1,1463 mg/100g in raw vegetables; and 12,1401 to 18,3931 mg/100g in vegetable oils. The vitamin content of the prepared foods in the different restaurants was not statistically different, except between the raw and cooked/sauteed foods for some compounds. The process of sautéing increases the vitamin E concentration due to the oil addition and the cooking of broccoli and eggs seem not to have caused great losses. Among the appraised foods,

spring greens, rocket, watercress and soy, canola and olive oils, if consumed in the recommended portions, can contribute to a daily vitamin E adequation in the order from 7,1 to 13,8%. This study contributed to the nutritional characterization of the foods in relation to the vitamin E, and works of this nature should be continued.

1. INTRODUÇÃO

Desde que foi descoberta no início dos anos 20, a vitamina E tem sido extensivamente estudada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que desempenha papéis especialmente importantes na reprodução normal e em mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais. Os estudos iniciais, que avaliavam o efeito da nutrição na reprodução de ratos, foram capazes de identificar um fator dietético que, na ocasião, foi considerado determinante para a manutenção da gestação em animais alimentados com dietas ricas em gordura rancificada. A partir disso, inúmeras pesquisas foram realizadas para isolamento e caracterização desse composto, sendo que somente em 1968 o Food and Nutrition Board reconheceu oficialmente essa substância como vitamina (BALL, 1998; AZZI e STOCKER, 2000).

A vitamina E tem natureza essencial e, portanto, deve ser obtida pela dieta em níveis adequados às necessidades do organismo. Até então, a síndrome de deficiência é considerada rara em humanos, provavelmente devido à ampla distribuição desta vitamina em alimentos de origem vegetal e alguns tecidos animais (EITENMILLER, 1997). No entanto, embora a deficiência não represente um problema de significância nutricional, a ingestão de vitamina E tem despertado interesse e preocupação principalmente nesta última década, uma vez que compõe juntamente com a vitamina C, β -caroteno, selênio e flavonóides, o grupo denominado antioxidantes alimentares. Este grupo tem sido freqüentemente associado à prevenção de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (BRON e AMIS, 2001; TRABER et al., 2001; BIERI, 2002).

Semelhante a outras vitaminas que não são representadas por uma estrutura química bem definida, a vitamina E possui dois grupos de compostos lipossolúveis intimamente relacionados, que diferem na estrutura de acordo com o número e localização de grupos substituintes no anel cromanol. Assim, o termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (AIN, 1979; RUPÉREZ et al., 2001).

Os resultados das pesquisas envolvendo esses compostos foram compilados pelo National Research Council, que estabeleceu atividades biológicas diferentes para os isômeros da vitamina E (NRC, 1989). Este conceito foi utilizado ao longo dos últimos anos para análise e representação do teor desta vitamina nas tabelas de alimentos.

Para a publicação das IDR's (Ingestão Dietética de Referência) em 2000, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos revisou as pesquisas sobre o assunto e considerou somente o α -tocoferol como composto biologicamente ativo (TRUMBO et al., 2003). Embora a desconsideração dos demais isômeros para a contribuição vitamínica em humanos esteja causando discussões entre os especialistas na área, a nova recomendação alterou o panorama de estudos relacionados e exerceu um grande impacto sobre os dados de tabelas de composição já existentes (MURPHY, 2002).

O teor de vitamina E nos alimentos sofre interferência de muitas variáveis, como condições de cultivo e colheita, características do solo, clima, estocagem, processamento e refinamento, entre outros (EINTENMILLER, 1997). Isso explica, em parte, a grande variabilidade das informações sobre o conteúdo vitamínico encontradas na literatura e indica que as mesmas devem ser utilizadas com cautela.

A vitamina E está difundida em tecidos de vegetais e, em menor proporção, em alimentos de origem animal, como ovos e fígado. Os óleos vegetais são considerados as fontes mais importantes, seguidos pelas sementes oleaginosas e vegetais folhosos verde-escuros (KRINSKY, 2003). Dentre esses alimentos, os óleos são alvo de um maior número de estudos e, portanto, são melhor caracterizados quanto ao seu conteúdo de vitamina E.

As informações acerca do teor de vitamina E em vegetais e ovos são bastante escassas e se restringem a espécies cultivadas em países com hábitos, clima e condições de cultivo bem diferentes do Brasil. Para certos tipos de alimentos comumente consumidos no país não existe nenhum dado sobre o conteúdo de tocoferóis, o que dificulta a avaliação da ingestão dessa vitamina pela população brasileira.

Considerando o grande consumo desses alimentos no Brasil (IBGE,1998) percebe-se portanto, a importância de se analisar o seu

conteúdo de vitamina E, além de outros produtos que são constantemente desenvolvidos pelas indústrias e instituições de pesquisa. Os alimentos processados a nível domiciliar e em Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) (restaurantes comerciais, institucionais, unidades hospitalares, escolares, entre outros) também necessitam ter seu conteúdo vitamínico avaliado, como meio de estimar mais precisamente a adequação de vitamina E e informar aos consumidores os níveis ingeridos (adaptado de PINHEIRO-SANT'ANA, 1998).

O número de pessoas que realizam suas refeições em restaurantes comerciais e institucionais aumenta a cada ano, sendo que a estimativa de refeições servidas em UAN's no ano de em 2003 foi de aproximadamente 40 milhões de unidades diárias, o que destaca a importância do setor de alimentação coletiva (ABERC, 2004). O conhecimento do conteúdo de micronutrientes em alimentos preparados nestes locais ainda é muito pequeno, embora a preocupação com a qualidade nutricional das refeições oferecidas já seja notória.

Surge, então, a necessidade de aumentar as informações sobre o conteúdo de vitamina E de alimentos na forma que são consumidos pela população em restaurantes, além de avaliar a precisão do conteúdo desta vitamina em óleos vegetais comercializados no país. Salienta-se também que, embora o α -tocoferol seja o composto utilizado atualmente para determinação do conteúdo de vitamina E, dados sobre a distribuição dos demais isômeros devem ser ainda avaliados, por serem úteis para a investigação de tocoferóis e tocotrienóis como antioxidantes em diversos sistemas biológicos, sozinhos ou associados a outros componentes dos alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o conteúdo e a distribuição dos isômeros da vitamina E em alimentos, preparações e óleos utilizados rotineiramente em restaurantes comerciais.

2.2. Específicos

- Otimizar uma metodologia para extrair e quantificar por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) em hortaliças, ovos e óleos vegetais.
- Determinar e avaliar o conteúdo dos isômeros da vitamina E em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados freqüentemente em restaurantes comerciais;
- Comparar as hortaliças em relação ao conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis;
- Comparar os óleos (canola, soja e oliva) em relação aos teores de tocoferóis e tocotrienóis;
- Avaliar a contribuição do conteúdo de α -tocoferol dos alimentos analisados para a adequação da vitamina E na dieta de indivíduos adultos brasileiros.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características Gerais da Vitamina E

A vitamina E é o termo utilizado para designar oito compostos encontrados em tecidos vegetais e animais, de característica lipossolúvel e que podem apresentar atividade vitamínica em graus diferenciados em sistemas biológicos (MACHLIN, 1991).

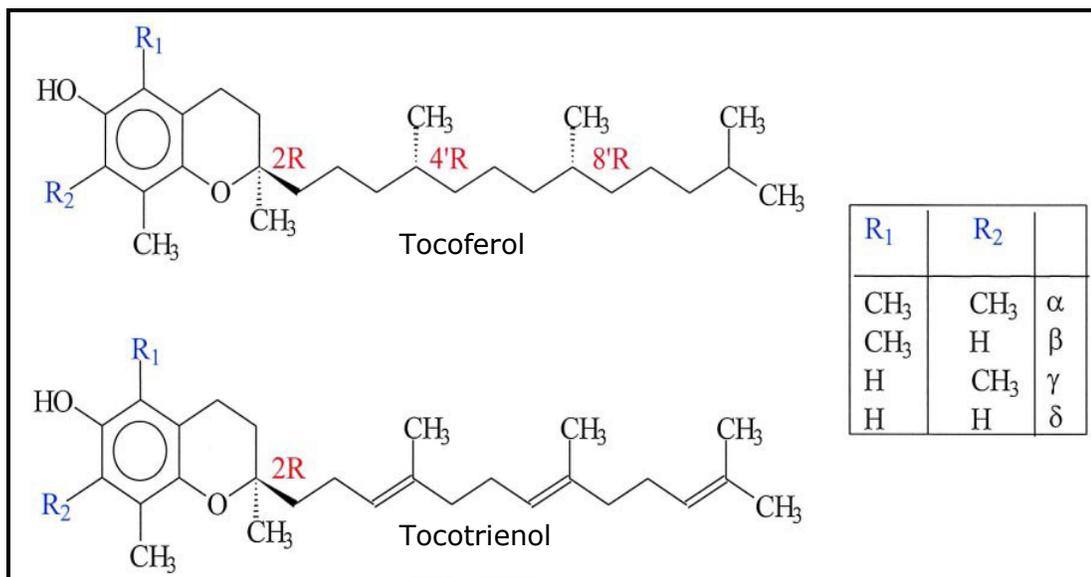
O termo “vitamina E” foi introduzido por Evans e Bishop em 1922, após identificarem uma determinada substância em seus estudos sobre reprodução em ratos. Nesses trabalhos, os pesquisadores administraram aos animais uma dieta composta de lípides à base de gordura suína e, em seguida, observaram que a mesma induzia a uma síndrome de deficiência não conhecida, cujo resultado era a reabsorção fetal em fêmeas em fase gestacional. Ao incluírem vegetais frescos à dieta os sintomas eram revertidos e, dessa forma, concluíram que os vegetais continham um fator específico responsável por esse resultado (AZZI e STOCKER, 2000).

A partir de 1936, começaram a surgir os primeiros conhecimentos acerca da natureza múltipla da vitamina E, quando dois compostos com atividade vitamínica E foram isolados a partir do óleo de germe de trigo. Esses compostos foram designados como tocoferóis, da expressão grega *tokos* (parto) e *phorein* (próximo), e posteriormente mais seis substâncias foram caracterizadas (MACHLIN, 1991).

Os oito compostos são classificados em dois grupos: tocoferóis, derivados do tocol; e tocotrienóis, derivados do tocotrienol. Ambos os grupos possuem um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral de natureza isoprênica constituída de dezesseis átomos de carbono, o que confere característica lipossolúvel à vitamina E (RUPÉREZ et al., 2001). Os tocoferóis são compostos contendo grupamentos metil-substituintes e cadeia lateral saturada, enquanto que os tocotrienóis apresentam estrutura idêntica, exceto pela presença de três duplas ligações na cadeia carbônica (BALL, 1998).

Tanto tocoferóis como tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isômeros que são diferenciados de acordo com o número e localização dos

grupos substituintes metil no anel cromanol e designados como α (alfa), β (beta), γ (gama) e δ (delta), conforme apresentado na Figura 1 (AIN, 1979; SHEPPARD et al., 1992).



Fonte: AZZI e STOCKER, 2000.

Figura 1. Compostos naturais da vitamina E.

A molécula tocol exibe isomerismo óptico atribuído aos três átomos de carbono assimétricos nas posições 2', 4' e 8', totalizando oito formas estereoisoméricas possíveis. Os tocotrienóis possuem somente um centro de assimetria na posição 2', em adição aos locais de isomerismo geométrico nos carbonos 3' e 7' da cadeia insaturada. O sistema *RS* de configuração assimétrica é usado para especificar a quiralidade dos compostos da vitamina E, de acordo com as normas da IUPAC de 1974 (BALL, 1998).

Estes centros quirais apresentam configurações R (do latim *rectus* = direita) ou S (*sinister* = esquerda). Na natureza, os tocoferóis ocorrem exclusivamente como estereoisômeros *RRR*- (ou *d*- α -tocoferol, para isômero α). Já a forma sintética, obtida a partir da reação entre trimetilhidroquinona como isofitol sintético, é uma mistura racêmica (*all-rac*- α -tocoferol) dos oito possíveis estereoisômeros em proporções virtualmente iguais (*RRR*-, *RRS*-,

RSR-, *RSS-*, *SRR-*, *SRS-*, *SSS-*, *SSR-*). Somente um deles portanto, é idêntico à forma natural *RRR-* (DROTLEFF e TERNES, 2001).

As diferenças na estereoisomeria da cadeia lateral, a despeito da estrutura molecular idêntica, influenciam o aproveitamento dos compostos pelo organismo. No entanto, as técnicas analíticas utilizadas comumente para a análise de vitamina E não distinguem os estereoisômeros (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

Atualmente, as principais formas comerciais disponíveis de vitamina E, utilizadas para o enriquecimento de alimentos e na indústria farmacêutica e cosmética, são os ésteres de acetato de *RRR*-*dl*- α -tocoferol, obtido de fontes naturais através da destilação molecular e metilação da mistura dos quatro isômeros tocoferóis ou pela hidrogenação de α -tocotrienol; e de *all-rac*- α -tocoferol. O acetato de α -tocoferol é a forma mais estável e, conseqüentemente, muito utilizada para a fabricação de suplementos e enriquecimento de alimentos (AZZI e STOCKER, 2000).

O α -tocoferol apresenta cor amarelo-clara e aspecto oleoso e é insolúvel em água, mas prontamente solúvel em óleos, gorduras, acetona, álcool, éter, clorofórmio e outros solventes orgânicos. A absorção de tocoferóis e tocotrienóis na região ultra violeta (UV) é fraca, sendo que a absorção máxima é obtida em comprimentos de ondas de 292 a 298 nm (BALL, 1998).

Tocoferóis não-esterificados possuem forte fluorescência natural, o que permite a aplicação de técnicas sensíveis de análise para detecção de pequenas concentrações séricas e em outros tecidos animais e vegetais. Os valores empregados para emissão e excitação são 295 e 330 nm, respectivamente, estabelecidos por Dugan et al. (1957) e utilizados até o presente (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

Os compostos são estáveis ao calor e em meio alcalino na ausência de oxigênio e não são afetados por ácidos a temperaturas de até 100°C. A oxidação é acelerada pela exposição à luz, calor e na presença de ferro e sais de cobre (BALL, 1998).

3.1.1. Mecanismos de Absorção, Transporte e Metabolismo

Os mecanismos envolvidos nos processos de absorção e metabolismo da vitamina E ainda não são bem conhecidos e têm gerado muita controvérsia, principalmente no que diz respeito ao aproveitamento dos diferentes isômeros pelo organismo (BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002).

Uma vez ingerida, a absorção de vitamina E ocorre de forma ineficiente em humanos, visto que somente 20 a 40% do α -tocoferol são absorvidos (BALL, 1998; BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002). Ao contrário de muitas substâncias, sua absorção não é dose-dependente e, ao contrário, pode ser reduzida com o aumento da sua concentração no meio intestinal. A eficiência é comprovadamente acentuada pelo consumo simultâneo de gordura na dieta, sendo que a quantidade necessária para a absorção ótima dos compostos da vitamina ainda não é conhecida (SCOTT et al., 2004). Além disso, a presença da bile e de enzimas pancreáticas também colabora para o aumento da absorção (COHN, 1997).

A absorção máxima ocorre no intestino delgado, a partir da emulsificação simultânea com outros componentes lipossolúveis dos alimentos, solubilização e formação de micelas, as quais são difundidas de forma passiva através da mucosa (COHN, 1997).

Devido a sua característica hidrofóbica, a vitamina E requer mecanismos especiais de transporte no meio aquoso do plasma, fluídos corporais e células. Desse modo, juntamente com triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol e apolipoproteínas, os compostos absorvidos são incorporados aos quilomícrons nas células da mucosa e assim alcançam a circulação linfática e, em seguida, a corrente sanguínea via ducto torácico. Até esta etapa, existe uma grande probabilidade que nenhuma discriminação ocorra entre os diferentes compostos (BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002).

Depois de submetidos à ação da lipase lipoprotéica, os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado e, a partir deste momento, ocorre uma clara diferenciação entre os isômeros da vitamina E com relação à liberação no plasma (AZZI e SOCKER, 2000). No fígado, uma proteína específica de transferência do α -tocoferol (α -TTP) parece ser seletiva ao mediar a transferência deste composto para as lipoproteínas. A α -TTP

portanto, incorpora preferencialmente α -tocoferol à VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) em detrimento a todas as outras formas da vitamina E (TRABER et al., 1992; TRABER e JIALALB, 2000; BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002).

Essa biodiscriminação acontece devido à afinidade diferenciada que os oito compostos apresentam em relação a α -TTP, que parece possuir maior estereoespecificidade para a forma natural de α -tocoferol. Em consequência do mecanismo de transferência seletivo, a maior parte dos homólogos naturais da vitamina E e formas sintéticas do α -tocoferol são excluídos do plasma e secretados pela bile, urina (após conversão para formas hidrofílicas carboxietilhidrocromano-CECHs) ou outras rotas desconhecidas (COHN, 1997).

Todas as lipoproteínas plasmáticas podem constituir veículos de transporte do α -tocoferol. No entanto, a α -TTP parece incorporar esse composto preferencialmente às frações VLDL, que sofre o metabolismo normal das lipoproteínas plasmáticas e é então distribuída aos tecidos. (COHN, 1997; TRABER e JIALALB, 2000). Recentemente, uma proteína ligante de tocoferóis (*Tocopherol-Associated Protein* - TAP), localizada nas células de diversos tecidos, foi identificada, embora suas funções ainda não tenham sido bem caracterizadas (AZZI e STOCKER, 2000; YAMAUCHI et al., 2001). Os pesquisadores suspeitam que essa proteína pode estar relacionada com a retenção dos diferentes compostos da vitamina E nos tecidos antes mesmo da discriminação realizada pelo fígado, embora só tenham descoberto, até então, uma proteína com afinidade exclusiva pelo α -tocoferol (YAMAUCHI et al., 2001; BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2002). Isso auxiliaria no entendimento da distribuição diferenciada que alguns compostos apresentam no organismo, como no caso do γ -tocoferol, que é acumulado no tecido adiposo, pele e músculos (JIANG et al., 2001).

3.1.2. Biodisponibilidade e Atividade Biológica de Tocoferóis e Tocotrienóis

Ao assumir que há uma proporcionalidade entre a concentração do α -tocoferol plasmático e a encontrada nos tecidos, pode-se definir a biodisponibilidade como sendo a proporção entre a quantidade absorvida

deste composto e sua liberação na circulação sanguínea. Para os demais homólogos, não se sabe se tal definição pode ser empregada (COHN, 1997).

Grande parte dos estudos acerca da biodisponibilidade da vitamina E são comparativos, sendo a diferença entre os compostos investigados (SCOTT et al., 2004). Existe um interesse especial em comparar a biodisponibilidade de α - e γ -tocoferol, uma vez que embora o primeiro possua maior biopotência *in vivo*, o γ -tocoferol é um dos compostos predominantes na dieta e, portanto, considerado relevante por sua ampla distribuição nos alimentos (JIANG et al., 2001; DEVARAJ e TRABER, 2003).

Com base nestes estudos, observou-se que o γ -tocoferol apresentou concentrações plasmáticas e teciduais que correspondem entre 10 e 20% daquelas encontradas para o α -tocoferol. Além disso, em pesquisa com humanos verificou-se que a forma sintética da vitamina E possui cerca da metade da biodisponibilidade da forma natural (JIANG et al., 2001; SCOTT et al., 2004). Nas últimas décadas, aumentou-se o interesse acerca do efeito do estilo de vida sobre a biodisponibilidade de vitaminas. Fumo, álcool e hábitos alimentares têm sido estudados (VAN DEN BERG et al., 2002).

Assim que os mecanismos envolvendo a absorção e metabolismo dos oito compostos da vitamina E foram sendo parcialmente esclarecidos, a atividade biológica dos mesmos também passou a ser melhor investigada, uma vez que os estudos iniciais datam de 1949. Os trabalhos clássicos de avaliação da atividade biológica envolveram a determinação experimental da eficiência de cada homólogo em prevenir a reabsorção fetal em ratos e os valores encontrados foram extrapolados para humanos sem ajustes para a espécie (SHEPPARD et al., 1992; EITENMILLER, 1997; AZZI e STOCKER, 2000).

O National Research Council (NRC), com base em estudos realizados com animais e humanos, destacou a existência de dois grupos de compostos encontrados na natureza que possuem atividade biológica de vitamina E, os tocoferóis e tocotrienóis. Dentre eles, o α -tocoferol é a forma mais ativa, sendo que os valores para os outros compostos foram estabelecidos em relação a este composto principal. Portanto, o comitê

estipulou para fins dietéticos, que a atividade vitamínica deveria ser expressada como equivalentes de α -tocoferol (α -TE) (NRC, 1989).

A unidade de 1 α -TE foi definida como sendo a atividade de 1 mg da forma natural de α -tocoferol. Assim, o conteúdo total de α -TE de alimentos seria estimado utilizando os fatores de conversão baseados em sua atividade biológica, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade de vitamina E de tocoferóis e tocotrienóis.

Composto	Atividade de α-TE^{1, 2} (mg/mg composto)
<i>RRR</i> - α -tocoferol	1,0
<i>RRR</i> - β -tocoferol	0,5
<i>RRR</i> - γ -tocoferol	0,1
<i>RRR</i> - δ -tocoferol	0,03
<i>RRR</i> - α -tocotrienol	0,3
<i>RRR</i> - β -tocotrienol	0,05
Acetato de α -tocoferil (sintético)	0,74

¹ A atividade biológica de γ - e δ -tocotrienol é desconhecida.

² Equivalentes de α -tocoferol

Fonte: NRC, 1989.

Até o ano de 2000, todas as determinações dos isômeros da vitamina E realizada em alimentos foram expressas em mg de α -TE, seguindo os valores indicados das Recommended Dietary Allowances (RDA's) de 1989. Neste ano, o Comitê de Alimentação e Nutrição (Food and Nutrition Board), do Instituto de Medicina dos Estados Unidos publicou novas recomendações para vitaminas e minerais, que substituíram as RDA's até então em vigor (NRC, 1989; IOM, 2000). Para isso, revisou trabalhos existentes sobre o assunto e concluiu que somente α -tocoferol é um composto biologicamente ativo da vitamina, uma vez que a sua concentração plasmática é mantida em níveis consideráveis pelo organismo, enquanto que os demais compostos absorvidos são quase que totalmente excretados (TRABER, 2001). Além disso, a atividade biológica do α -tocoferol sintético foi reduzida para 50% (BURTON et al., 1998; TRUMBO et al., 2003).

Assim, os valores das IDR's (Ingestão Dietética de Referência) para vitamina E desconsideram os demais isômeros e, portanto, tais revisões alteram o valor nutricional de muitos alimentos, como óleos vegetais, molhos para salada, margarinas e folhosos verde-escuros, em tabelas e bases de dados de composição (MURPHY, 2002; TRUMBO, 2003).

3.1.3. Recomendações Nutricionais para Vitamina E

Com base em estudos de atividade biológica dos oito diferentes compostos da vitamina E e em evidências acerca do papel protetor que esta vitamina desempenha contra diversos processos patológicos, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos estabeleceu novos níveis de ingestão recomendados, direcionados a diversas faixas etárias da população americana e canadense, mas que são adotados por diversos países (IOM, 2000).

Essas recomendações (IDR's) são valores de referência de estimativas quantitativas da ingestão de nutrientes a serem utilizadas para o planejamento e avaliação dietética de indivíduos saudáveis (TRUMBO et al., 2003).

As definições da RDA's de 1989 incluem tanto as formas naturais como as formas sintéticas nas suas recomendações de ingestão. A quantidade indicada para consumo diário de vitamina E por indivíduos adultos é de 10 mg de equivalentes de α -tocoferol (NRC, 1989). De acordo com a nova proposta, a expressão em mg de α -TE recomendada pelo National Research Council superestimava a atividade vitamínica E nos alimentos e portanto, foi substituída por mg de α -tocoferol natural e ou sintético (IOM, 2000).

Baseados em dados de levantamentos populacionais realizados nos Estados Unidos, verificou-se que 80% dos equivalentes de α -tocoferol determinados nestes trabalhos eram provenientes de alimentos que continham o α -tocoferol como composto principal (TRUMBO et al., 2003).

Para estimar a ingestão atual de α -tocoferol, os dados de α -TE encontrados em tabelas de composição de alimentos devem ser corrigidos por um fator 0,8. Dessa forma:

mg de α -tocoferol num alimento ou refeição \approx mg de α -TE x 0,8 (TRUMBO et al., 2003).

Em geral, as IDR's apresentam valores mais elevados quando comparados às recomendações de 1989. Para indivíduos adultos (considerando valores de RDA), houve um aumento de cerca de 50% na recomendação de ingestão, fato que têm causado muitas controvérsias entre os especialistas da área (BIERI, 2002). Para alguns pesquisadores, a recomendação de 15 mg/dia de α -tocoferol tem por fim desempenhar papel preventivo no surgimento de doenças relacionadas com a ação dos radicais livres no organismo, e que atualmente apresentam prevalência elevada na população (TRABER, 2001). Outros estudiosos afirmam que o aumento na recomendação não é sustentada por nenhuma informação proveniente de novas pesquisas e, dessa forma, considerada arbitrária uma vez que a deficiência de vitamina E não é freqüentemente observada, mesmo em populações com ingestão abaixo de 10 mg de α -TE/dia (HORWITT, 2001).

Segundo esses pesquisadores, as recomendações elevadas das IDR's vêm atender interesses comerciais envolvendo a indústria farmacêutica e o mercado de suplementos. Além disso, a eliminação de outros isômeros como o γ -tocoferol da avaliação dietética da vitamina E é bastante criticada, uma vez que o metabolismo dos compostos ainda não é bem conhecido e novas proteínas ligantes vem sendo descobertas atualmente (HORWITT, 2001; BIERI, 2002).

Os riscos envolvendo o uso excessivo do α -tocoferol também têm sido relatados na literatura. O nível diário máximo tolerável de 1.000mg/dia deve ser aplicado com cautela, uma vez que o consumo excessivo de vitamina E pode implicar em riscos de hemorragias em humanos, principalmente se associados a outros compostos antitrombóticos, como a aspirina (HORWITT, 2001). Além disso, para se obter dietas com ofertas de 15 mg/dia de α -tocoferol, grandes quantidades de alimentos ricos em lípides insaturados serão necessários (fontes principais), que por sua vez, aumenta a necessidade de vitamina E pelo organismo, principalmente se os lípides forem oxidados (HORWITT, 2001; BIERI, 2002).

Os valores de IDR's para vitamina E, bem como sua comparação como as RDA's de 1989, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Recomendações nutricionais de vitamina E para indivíduos saudáveis de diferentes estágios de vida.

Estágios de Vida	Vitamina E (mg/dia)			
	EAR	RDA/AI*	UL	RDA (1989)
Lactentes				
0-6 m	-	4*	ND	3
7-12 m	-	5*	ND	4
Crianças				
1-3 a	5	6	200	6
4-8 a	6	7	300	7
Homens				
9-13 a	9	11	600	10
14-18 a	12	15	800	10
19-30 a	12	15	1000	10
31-50 a	12	15	1000	10
51-70 a	12	15	1000	10
Mulheres				
9-13 a	9	11	600	8
14-18 a	12	15	800	8
19-30 a	12	15	1000	8
31-50 a	12	15	1000	8
51-70 a	12	15	1000	8
Gestação				
≤ 18 anos	12	15	800	10
19-30 a	12	15	1000	10
31-50 a	12	15	1000	10
Lactação				
≤ 18 anos	16	19	800	11
19-30 a	16	19	1000	11
31-50 a	16	19	1000	11

EAR (Necessidade Média Estimada); RDA (Ingestão Dietética Recomendada); AI (Ingestão Adequada); UL (Limite Superior Tolerável de Ingestão);

Fonte: IOM, 2000.

3.2. Funções da Vitamina E

É bem estabelecido na literatura que a atividade antioxidante parece ser o principal papel biológico da vitamina E, embora não seja o único mecanismo de atuação dessa substância (RUPÉREZ et al., 2001).

3.2.1. Função Antioxidante

Juntamente com a vitamina C, β -caroteno e selênio, a vitamina E compõe o grupo de nutrientes conhecidos como “antioxidantes alimentares”,

do qual é considerado o mais efetivo e mais abundantemente encontrado nas membranas celulares de mamíferos (PERCIVAL, 1998; RUPÉREZ et al., 2001).

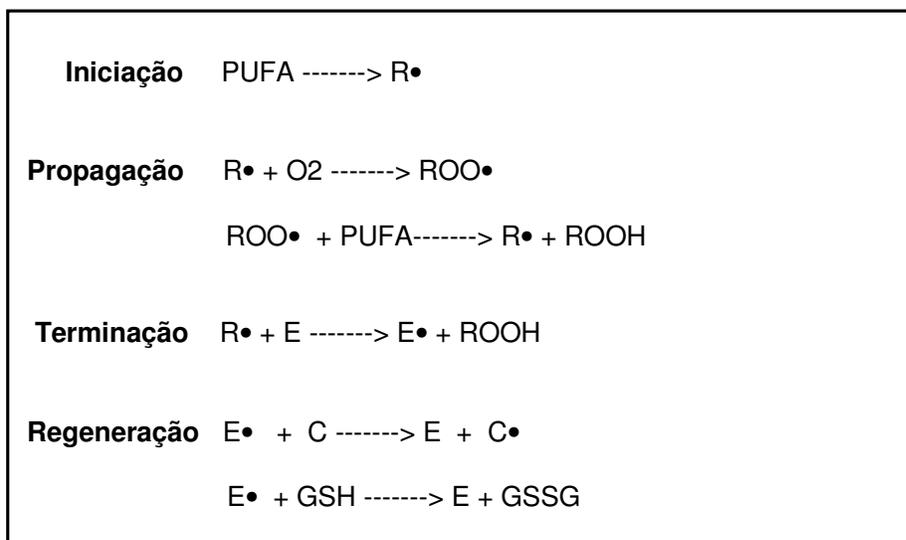
Segundo o Instituto de Medicina dos Estados Unidos (2000), antioxidantes alimentares são substâncias encontradas nos alimentos que reduzem significativamente os efeitos adversos de espécie reativas (radicais livres) nas funções fisiológicas normais em humanos.

Os processos de oxidação, tanto em alimentos quanto no organismo, envolvem reações entre moléculas reativas de oxigênio e lipídeos, que uma vez iniciadas, se propagam em cadeia com geração constante de radicais livres. Essas espécies reativas e outros radicais livres são capazes de reagir diretamente com os lipídeos, principalmente os compostos de ácidos graxos insaturados, mais susceptíveis à oxidação (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

O mecanismo que envolve a peroxidação lipídica depende de um iniciador, que pode ser a luz, calor, íons superóxido e peróxido, metais, radiação e enzimas, entre outros. Radicais livres são então formados a partir de ácidos graxos e desencadeiam a propagação das reações de oxidação em cadeia (PINCHUK e LICHTENBERG, 2002).

A cadeia pode ser interrompida pela ação de substâncias que estabilizam esses radicais livres, impedindo a formação de novos radicais e continuidade das reações. A vitamina E constitui-se num dos “quebradores” de cadeia mais eficientes, reagindo 200 vezes mais rapidamente com um radical peroxila do que um antioxidante sintético, como o butilhidróxidotolueno (BHT) (PINCHUK e LICHTENBERG, 2002). Outras substâncias endógenas (catalase, superóxido-dismutase, glutadiona peroxidase) e alimentares (vitaminas E, C, β -caroteno, flavonóides) também atuam interrompendo as reações de radicais livres (PERCIVAL, 1998).

A Figura 2 mostra as etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica e ação antioxidante da vitamina E.



PUFA: ácido graxo poliinsaturado; R•: Radical; ROO•: radical peroxil; E: vitamina E; E•: radical tocoferoxil; ROOH: hidroperóxido; GSH: glutadiona oxidada; C: ácido ascórbico; C•: radical ascorbil; GSH: glutadiona reduzida; GSSG: glutadiona

Figura 2. Oxidação e reações antioxidantes envolvendo a vitamina E.

A vitamina E atua como doador de hidrogênio, interrompendo a cadeia de reações pois o radical tocoferoxil formado não apresenta reatividade sobre a estrutura lipídica. Esse papel antioxidante é desempenhado de forma única, uma vez que interage com o ambiente lipídico de forma acentuada devido a sua característica lipofílica. Além disso, a estrutura da vitamina E está localizada entre os componentes da membrana celular e assim, é uma das responsáveis pela linha de defesa primária das células contra o ataque de radicais livres. Possui ainda, a característica de ser o único antioxidante que tem habilidade de regenerar-se continuamente pela ação da vitamina C ou glutadiona (MACHLIN, 1991).

A oxidação lipídica pode apresentar efeitos de grande impacto biológico *in vivo*, pelo dano às membranas biológicas, formação de radicais livres e favorecimento do *stress* oxidativo e, em alimentos, pela oxidação dos lípidos e alteração da qualidade sensorial (HUANG et al., 2002). A oxidação é considerada como um dos mais sérios problemas na indústria de alimentos, induzindo a perda na qualidade nutricional, alteração da cor, odor e sabor. Além disso, a segurança do alimento pode ser comprometida, uma vez que pode ocorrer formação de produtos secundários prejudiciais à saúde (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

No organismo, a oxidação pode causar e interferir no processo de diversas doenças, além de ruptura da membrana celular, polimerização de proteínas, mutações no DNA e alterar funções das plaquetas e macrófagos (PERCIVAL, 1998; HUANG et al., 2002).

Stress oxidativo designa o estado em que a geração de radicais livres excede a capacidade orgânica de “depuração” dos mesmos. Esse excesso é um componente que tem sido constantemente associado ao desenvolvimento de aterosclerose, doenças degenerativas, inflamação, câncer e envelhecimento (PERCIVAL, 1998; IOM, 2000; LIU et al., 2003).

Desse modo, a vitamina E parece apresentar importante papel nos mecanismos preventivos de doenças crônico-degenerativas (JIANG et al., 2001; HUANG et al., 2002), como por exemplo:

- Doenças cardiovasculares: a vitamina E parece prevenir ou retardar o desenvolvimento de doenças coronarianas, promovendo uma menor oxidação da LDL e formação de coágulos;
- Câncer: exerce efeito protetor ao organismo pela redução do dano oxidativo, o qual pode contribuir para a carcinogênese. Também parece acentuar a função imune e bloquear a formação de nitrosaminas no estômago (nitritos da dieta);
- Catarata: maiores níveis séricos de vitamina E (suplementos) parecem reduzir o risco de catarata;
- Doenças neurológicas (Parkinson, Alzheimer): resultados preliminares indicam que as vitaminas E e C podem melhorar os sintomas dessas patologias;
- Diabetes mellitus: os resultados dos estudos ainda não são conclusivos, mas supõe-se que o dano oxidativo também contribui para o desenvolvimento desta doença.

Dentre os compostos da vitamina E, o α -tocoferol é apontado como sendo o mais potente em sua ação antioxidante (YOSHIDA et al., 2003). No entanto, diversos trabalhos indicam outros tocoferóis como melhores antioxidantes. Essas controvérsias podem ocorrer devido a diferenças entre os métodos testados, os substratos utilizados, o nível de oxidação

empregado e as metodologias empregadas para monitoramento da oxidação. Alguns resultados apontam atividade antioxidante dos tocoferóis na seguinte ordem: γ , $\delta > \alpha$ e β ; $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ e $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ (SERBINOVA et al., 1992; FRANKEL, 1996).

No entanto, um número cada vez maior de estudos tem apontado os tocotrienóis como sendo os compostos mais potentes na atividade antioxidante *in vitro*, mas pesquisas *in vivo* ainda devem ser melhor conduzidas (SERBINOVA et al., 1992; MUTALIBI et al., 2003; YOSHIDA et al., 2003).

Embora tenha propriedade antioxidante já bem reconhecida, os tocoferóis podem também atuar como pró-oxidantes em algumas condições, principalmente quando estão presentes em grandes concentrações no meio de estudo. Assim como para a atividade antioxidante, a avaliação da ação pró-oxidante dos diferentes compostos pode sofrer interferência do sistema e das concentrações testadas, do tempo de oxidação e do método usado para conduzir o processo oxidativo (FRANKEL, 1996).

Observou-se atividade pró-oxidante do α -tocoferol em óleos vegetais muito ricos nesse composto e em presença de metais de transição peróxido e sais de ferro e cobre (BIANCHINI-PONTUSCHKA e PENTEADO, 2003).

3.2.2. Papéis Não-Antioxidantes

Os compostos da vitamina E, excetuando-se o β -tocoferol, desempenham funções não-antioxidantes no organismo, relacionadas principalmente à atividade bioquímica e molecular do α -tocoferol e que ainda não estão muito bem esclarecidas (AZZI e STOCKER, 2000; IOM, 2000), como:

- Regulação da proteína quinase C: o α -tocoferol parece inibir a proteína quinase C, que está envolvida numa série de rotas metabólicas, como as responsáveis pela proliferação e diferenciação celular do músculo, plaquetas e monócitos (resposta inflamatória);
- Efeito antitrombótico: O α -tocoferol inibe algumas das reações que levam a formação de tromboxano (potente fator de agregação plaquetária) e

favorece a formação de prostaciclina (vasodilatadora e antiagregatória), reduzindo esse processo;

- Inibição de enzimas: inibe a lipoxigenase e fosfolipase, enzimas que participam da oxidação lipídica (efeito antioxidante secundário);
- Função estrutural: faz parte da composição da membrana das mitocôndrias, protegendo-as de danos oxidativos por meio de uma série de reações intracelulares;
- Síntese de hormônios: participa da formação de hormônios sexuais, embora tenham sido observados, *in vivo*, prejuízos na síntese em situações de deficiência vitamínica.

3.3. Ocorrência da Vitamina E nos Alimentos

A vitamina E é amplamente distribuída na natureza, sendo sintetizada exclusivamente em vegetais e acumulada, em pequenas proporções, em alguns tecidos animais na forma de α -tocoferol (CHING e MOHAMED, 2001).

Os oito compostos da vitamina são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que as fontes principais são óleos vegetais, germe de trigo, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e fígado (SHEPPARD et al., 1992; SRIDHAR e LAKSHMINARAYANA, 1993; CHEN et al., 1998). Os isômeros mais abundantes nesses alimentos são o γ - e o α -tocoferol (JIANG et al., 2001). Atualmente, não se pode deixar de considerar a utilização de alimentos enriquecidos e fortificados, como grandes fontes de vitamina E.

Os óleos vegetais, além de possuir altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo a nível mundial, constituindo-se portanto, no alimento de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população. Dados de NHANES II, um levantamento de consumo realizado nos Estados Unidos, indicam que 20% da vitamina E da dieta americana são provenientes da ingestão de óleos e gorduras (EINTE MILLER, 1997).

No entanto, considerando que os óleos vegetais são matéria prima e ou entram na composição de muitos alimentos industrializados, este percentual pode superar 50% (EINTEMILLER, 1997). Dentre todos os alimentos, os óleos são os melhores caracterizados quanto ao seu conteúdo em vitamina E e composição em isômeros (SHEPPARD et al., 1992, DIONISI et al., 1995).

Dos óleos avaliados, o de girassol parece ser o mais rico em α -tocoferol, seguido pelo de algodão, palma, canola, amendoim, oliva, milho, soja e côco. O γ -tocoferol é o composto predominante em óleos de soja e de milho, sendo que o óleo de palma é o que apresenta maior teor de tocotrienóis (SYVAOJA et al., 1986; USDA, 2004). O óleo de soja, devido ao seu grande consumo a nível mundial, é o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população (EINTENMILLER, 1997).

O conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis em óleos é diretamente relacionado com o tipo de processamento aplicado. Assim, óleos refinados contêm um teor vitamínico reduzido em até 80%, de acordo com as condições empregadas (RUPÉREZ et al., 2001). Além disso, perdas podem acontecer depois de embalados, de acordo com as formas de estocagem, pela exposição à luz, oxigênio, altas temperaturas, entre outros (SIMONNE e EITENMILLER, 1998; BARRERA-ARELLANO et al., 2002). A utilização de óleos na cocção, especialmente em frituras, é uma das grandes fontes de degradação dos compostos, com perdas variando entre 40 a 98% (CARLSON E TABACHI, 1986; GORDON e KOURIMSKÁ, 1995; WYATT et al., 1998).

Entre os vegetais, os folhosos são freqüentemente apontados na literatura como boas fontes de vitamina E (PIIRONEN et al., 1986; SRIDHAR e LAKSHMINARAYANA, 1993). O composto predominante nesses vegetais é o α -tocoferol, que está localizado nos cloroplastos, sendo que sua concentração parece ser alta em tecidos verde-escuros, moderada em folhas de crescimento rápido e verde-claras e em frutas coloridas e baixa em raízes e tubérculos (PIIRONEN et al., 1986).

De acordo com PIIRONEN et al. (1986), vegetais que apresentam teores superiores à 1 mg de α -tocoferol/100g, podem ser considerados fontes ricas. Espinafre, salsa e pimentão são vegetais freqüentemente citados na

literatura como ricos em α -tocoferol (CHING e MOHAMED, 2001; USDA, 2004).

As informações sobre conteúdo de vitamina E em vegetais folhosos são muito escassas e os estudos existentes apresentam dados de vegetais cultivados comumente no local, sendo que muitas hortaliças encontradas no Brasil não são consumidas nestes países.

Uma grande variação nos valores de α -tocoferol pode ser observada em vegetais, que pode ser causada, além da variabilidade entre as espécies, por fatores como variedade da planta, distribuição desigual dos compostos, sendo que partes ricas mas não-comestíveis podem ser descartadas, grau de maturação, condições de cultivo e do solo, clima e aplicação de métodos diferentes para análise, entre outros (PIIRONEN et al., 1986; HEINONEN et al., 1997).

Com relação aos alimentos de origem animal, os ovos apresentam os maiores conteúdos em vitamina E, no entanto, o efeito do enriquecimento da alimentação de aves, comum em muitos países, não pode ser esquecido (SYVAOJA et al., 1985; KANG et al., 1998).

Não foi encontrado nenhum dado ou estudo anterior com relação ao teor de vitamina E de alimentos cultivados e ou produzidos no Brasil.

Uma vez que as recomendações de ingestão de óleos e gorduras vêm cada vez mais sendo controlada por órgãos ligados a Nutrição e profissionais da saúde e, por outro lado, o consumo de vegetais tem sido estimulado, pode-se perceber a importância de se conhecer o valor nutritivo (macro e micronutrientes) desses alimentos.

No Brasil, os resultados do último levantamento de consumo de alimentos a nível nacional, incluídos na Pesquisa de Orçamentos Familiares 1995-1996 (POF), indicam que as hortaliças, embora de ocorrência comum para grande parte da população, ainda não são ingeridas na quantidade sugerida pela "Pirâmide de Alimentos" (PHILIPPI et al., 1999). Os dados mostram que o consumo per capita anual de hortaliças folhosas é de aproximadamente 2,8 kg, o que representa uma média diária de apenas 7,7 gramas. Os dados de consumo de ovos e óleos, respectivamente 4,3 e 7,5 kg/ano/pessoa, indicam que estes alimentos são de grande consumo pela população (IBGE, 1998).

Esses dados indicam que existe uma grande lacuna a ser preenchida, com conhecimentos cada vez mais exatos acerca do valor nutricional de alimentos e práticas de educação nutricional, a fim de estimular o consumo de vegetais, alimentos ricos em nutrientes, pela população brasileira.

3.4. Metodologia para Determinação de Tocoferóis e Tocotrienóis em Alimentos

A complexidade estrutural e os diferentes potenciais antioxidantes do grupo de compostos com atividade de vitamina E requerem que técnicas analíticas fidedignas e seguras sejam aplicadas para a extração, separação, identificação e quantificação dos componentes individuais em diversos tipos de matrizes de amostras (KAMAL-ELDIN et al., 2000).

Além disso, a ocorrência natural de certos compostos em quantidades muito reduzidas faz com que seja necessário o uso de recursos e procedimentos analíticos sofisticados para concentração da amostra, obtenção de resolução eficiente e detecção sensível dessas substâncias (ABIDI, 2000).

Diversas técnicas têm sido aplicadas para separação, purificação e quantificação de tocoferóis e tocotrienóis nas mais variadas matrizes orgânicas e podem ser utilizadas de acordo com os objetivos de análise e da natureza da amostra (ABIDI, 2000; ABIDI e RENNICK, 2001).

Entre as técnicas empregadas, podem-se citar as colorimétricas, cromatografia de camada delgada, a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência, além de algumas ainda em desenvolvimento, como a eletroforese capilar (KAMAL-ELDIN et al., 2000; LEE et al., 2000; ABIDI e RENNICK, 2001).

Desde que foi utilizada para a análise de antioxidantes lipídicos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido extensivamente aplicada e é preferida pela grande maioria dos pesquisadores da área. Isso porque, em geral, envolve etapas menos prejudiciais à amostra quando comparada à cromatografia gasosa, muito utilizada até então (SHIN e GODBER, 1993).

A primeira separação entre α - e γ -tocoferol e dos demais compostos ocorreram em 1973 e 1974, respectivamente. Atualmente, esta separação

pode ser realizada por CLAE utilizando tanto sistema de fase normal, como de fase reversa. Para a análise de tocoferóis e tocotrienóis, o sistema de fase normal tem sido o de maior uso entre os trabalhos recentemente publicados, embora apresente desvantagens como o gasto de um longo tempo para equilíbrio da coluna, baixa reprodutibilidade e o emprego de solventes orgânicos voláteis prejudiciais (ABIDI, 2000; CERT et al., 2000).

Já o sistema de fase reversa, que apresenta maior estabilidade, durabilidade e melhor reprodutibilidade dos tempos de corrida nas análises de vitamina E, não é eficiente em separar os isômeros γ - e β - tocoferóis e ou tocotrienóis utilizando colunas de octadecilsilano (ODS). A introdução de novas colunas poliméricas nesse sistema parece separar esses dois compostos (RUPÉREZ et al., 1999; ABIDI e MOUNTS, 1997; ABIDI, 1999).

É importante destacar que, a escolha do sistema de análise utilizado depende dos compostos da vitamina E que se objetiva detectar. Portanto, análises mais simples são preferencialmente conduzidas em sistema de fase reversa, que proporciona análises mais rápidas e reprodutíveis. Por exemplo, o sistema de fase reversa com colunas tradicionais pode ser utilizado como a detecção de α -tocoferol isolado ou a análise de alimentos que possuem composição em isômeros e ou matrizes menos complexas (ABIDI e MOUNTS, 1997; TORRE et al., 2001; GÓMEZ-CORONADO e BARBAS, 2003).

A otimização dos parâmetros experimentais (fase estacionária, fase móvel, vazão e tipo de eluição, entre outros) é imprescindível para uma separação e quantificação eficazes dos compostos presentes nas amostras.

A eficiência na resolução dos isômeros γ - e β -, sejam tocoferóis ou tocotrienóis, é um dos critérios mais utilizados para avaliar a adequação das condições da análise cromatográfica dos compostos da vitamina E. A semelhança na estrutura desses dois compostos faz com que a retenção ocorra em tempos muito próximos, dificultando sua separação em determinados tipos de fase estacionária. A seletividade apresentada por algumas colunas de fase normal se deve à diferenciação que ocorre com base na posição dos substituintes metil no anel cromanol de isômeros γ - e β - e sua interação com o grupamento $-OH$ da coluna (INDYK, 1988; SHIN e GODBER, 1993).

A maior parte dos trabalhos utilizando fase normal emprega colunas de sílica não-ligadas com diâmetros das partículas entre 3 e 5 μm , de diversas especificações de fabricação, onde a retenção ocorre na ordem $\alpha < \beta \leq \gamma < \delta$ (KAMAL-ELDIN et al., 2000; PYKA et al., 2001).

Considerando essas colunas, a fase móvel de utilização mais comum é composta de hexano adicionado de uma variedade de modificadores orgânicos, como o éter dietílico, éter diisopropílico, metanol, isopropanol e dioxano. Esses reagentes, utilizados em pequenas quantidades, elevam a polaridade da mistura solvente a ponto de favorecer a resolução dos compostos (KAMAL-ELDIN et al., 2000). O uso de isopropanol em pequenas concentrações na fase à base de hexano tende a melhorar a separação dos compostos β - e γ - (ABIDI, 2000).

A adição de éteres pode implicar em risco de formação de peróxido e conseqüentemente, degradação dos compostos. Já o uso de álcoois é acompanhado pela dificuldade em obter uma proporção exata na fase móvel, uma vez que volumes relativamente muito pequenos desses reagentes são necessários devido à sua alta polaridade (HU et al., 1996).

Shin e Godber (1993) avaliaram o efeito de diferentes fases móveis sobre a estabilidade e reprodutibilidade de colunas de fase normal e observaram uma redução nos tempos de retenção para cada composto com o aumento do número de injeções. Tempos de corrida comparativamente mais curtos também foram obtidos após a adição de ácido acético numa das fases testadas. O ácido acético parece aumentar a estabilidade da coluna, provavelmente por competir com água (pequenas quantidades presentes nos reagentes) e outras substâncias polares pela ligação aos grupos hidroxila da coluna.

A eluição isocrática é utilizada na maior parte dos trabalhos encontrados na literatura e os tempos de corrida relatados variam entre 5 a 120 minutos. Utilizando as mesmas condições cromatográficas, corridas curtas são inversamente relacionadas com a resolução dos compostos, o que determina a importância da otimização das condições analíticas, a fim de se obter uma corrida rápida com máxima resolução analítica (ABIDI, 2000; PYKA et al., 2001).

Kamal-Eldin et al. (2000), comparando diferentes colunas na análise cromatográfica de tocoferóis e tocotrienóis, observaram que para todas as colunas de sílica testadas os compostos eluíram na ordem α -T (tocoferol) < α -T3 (tocotrienol) < β -T < γ -T < β -T3 < γ -T3 < δ -T < δ -T3.

Dentre as técnicas de detecção cromatográfica, a fluorescência é utilizada para a análise de tocoferóis e tocotrienóis na maior parte dos trabalhos realizados com CLAE. Essa preferência pela detecção de fluorescência é atribuída à sua maior seletividade, sensibilidade e especificidade em comparação à detecção por UV (ABDOLLAHI et al., 1993; RUPÉREZ et al., 2001).

A identificação dos compostos pela comparação dos tempos de retenção dos obtidos nas amostras com os dos padrões é uma prática comum entre os pesquisadores e tem se mostrado bastante confiável. No entanto, como levantado por Bianchini-Pontuschka e Penteado (2003), o tempo de retenção de um composto na matriz alimentar pode ser diferente do observado nos padrões vitamínicos puros. Isso indica que, para amostras contendo outras substâncias que são detectadas nos comprimentos de onda específicos, a identificação dos compostos deve ser feita com cautela e observando os dados existentes na literatura.

De uma forma geral, é necessário que os compostos de interesse sejam isolados para posterior análise cromatográfica. Os procedimentos de isolamento variam de acordo com a matriz da amostra e podem variar desde etapas complexas e com uso de múltiplos reagentes e equipamentos, a etapas simples, como diluição da amostra em solvente orgânico (GIMENO et al., 2000; LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001).

O tratamento da amostra é uma etapa considerada crítica no processo analítico e representa a principal fonte de erros, além de tempo consumido e grande gasto financeiro com reagentes e outros materiais (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001).

Exceto para a análise de óleos vegetais, os quais podem ser diluídos em solvente orgânico e injetados diretamente na coluna, a vitamina E deve ser extraída da matriz da amostra e, quando em baixos teores, deve ser também concentrada (DIONISI et al., 1995; CERT et al., 2000; RUPÉREZ et al., 2001).

O tratamento com solventes orgânicos e, em muitos casos, emprego da saponificação, é imprescindível para a purificação das amostras e extração dos compostos da matriz orgânica. O processo de extração permite romper as estruturas nas quais a vitamina E pode estar associada (membranas, lipoproteínas, partículas de gordura); eliminar interferências de moléculas de alto peso molecular tais como proteínas ou carboidratos, que são insolúveis em fases orgânicas; e propiciar um meio no qual os compostos podem estar totalmente solúveis (INDYK, 1988; LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001).

Para tocoferóis e tocotrienóis, a etapa de tratamento envolve com frequência o emprego da saponificação da amostra total ou de uma fração lipídica isolada (PIIRONEN et al., 1984; INDYK, 1988; LEE et al., 2000). O procedimento clássico é realizado por aquecimento de KOH em etanol ou metanol, seguido pela extração com solventes orgânicos dos componentes insaponificáveis, como a vitamina E, enquanto ácidos graxos, gliceróis e outras substâncias potencialmente interferentes permanecem na fase alcalina (RUPÉREZ et al., 2001). A extração com uso da saponificação pode ser influenciada pelo tipo e concentração do solvente orgânico utilizado e os níveis de lípidos presentes na amostra (UEDA e IGARASHI, 1990).

O uso da etapa de saponificação representa maior tempo consumido e aumento da complexidade do processo de tratamento da amostra, sendo que métodos alternativos de extração têm sido testados por diversos pesquisadores com resultados semelhantes ou superiores, o que têm demonstrado que a saponificação nem sempre é necessária (PIIRONEN et al., 1984; ALBALÁ-HURTADO et al., 1997; LEE et al., 1999).

Além disso, a saponificação pode promover a oxidação de vitaminas lipossolúveis e, portanto, representar perdas durante o processo de análise. Para isso, o uso de antioxidantes como butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico, pirogalol, sozinhos ou combinados, tem sido recomendado para evitar a degradação dos compostos da vitamina E durante esta etapa (RUPÉREZ et al., 2001).

A extração direta com solventes orgânicos tem sido empregada para a análise de tocoferóis e tocotrienóis como alternativa à saponificação e envolve um número menor de operações que agiliza a etapa de tratamento

da amostra. O solvente comumente utilizado é o hexano, sozinho ou com adição de pequenas proporções de solventes mais polares, como o etanol, acetado de etila ou éter diisopropílico (HU et al., 1996; LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001).

De qualquer forma, observa-se na literatura que métodos com ou sem emprego da saponificação têm sido aplicados para os mesmos tipos de amostras.

O aumento da consciência ambiental, tais como a necessidade de eliminar o uso de reagentes orgânicos e reduzir a incineração, é responsável, em parte, pelo direcionamento das pesquisas envolvendo novas técnicas de extração e análise de vitaminas. Alguns trabalhos já estão extraindo vitaminas lipossolúveis de alimentos e ou preparações a partir do uso de dióxido de carbono na forma de extração de fluídos supercrítica (SFE). Esta técnica é rápida e requer pouco ou nenhum uso e desperdício de reagentes pesados (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001; RUPÉREZ et al., 2001).

3.5. Importância de Estudos sobre Valor Nutritivo e Estabilidade de Nutrientes em Unidades de Alimentação e Nutrição

A escassez e discrepância das informações relacionadas a alimentos e preparações é uma queixa comum entre profissionais da área de nutrição e de alimentos, além dos consumidores em geral. Observa-se que tabelas de composição de alimentos e muitas pesquisas da área descrevem valores para alimentos não processados (*in natura*) e comercialmente preparados. Isso indica uma lacuna nas informações acerca do valor nutricional de alimentos e preparações na forma que são utilizados a nível domiciliar e em UAN's, quer seja em restaurantes institucionais ou comerciais.

As vitaminas são um dos mais importantes nutrientes que determinam a qualidade nutricional de alimentos. Considerando que as mesmas são afetadas pelo processamento em graus variados, o estudo do conteúdo e estabilidade se reveste de grande importância prática (WYATT et al., 1998).

A cocção e o processamento têm efeito determinante sobre o conteúdo vitamínico final de um alimento ou preparação e todas as

operações envolvidas devem ser melhor estudadas (HEINONEN et al., 1997).

O crescimento do setor de alimentação a nível mundial reforça a importância de estudos sobre valor nutritivo nesse segmento, uma vez que os procedimentos utilizados para preparação dos alimentos em grandes quantidades podem ser bem diferentes dos comumente conhecidos e aplicados em nível domiciliar e laboratorial, principalmente em relação a equipamentos, tempo e temperaturas aplicadas (HEINONEN et al., 1997).

Essa importância ganha dimensões ainda maiores quando os números do setor são avaliados. O Brasil não se diferenciou da tendência mundial e, segundo a Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas, o setor apresenta expectativa de crescimento anual de 10% e um potencial teórico para produção de 40 milhões de refeições diárias (ABERC, 2004).

Esses números são reflexo de uma prática atual, onde um número cada vez maior de indivíduos fazem suas refeições fora do lar (CAMPOS et al., 2003). Portanto, a preocupação acerca do valor nutricional da alimentação gradativamente se move em direção à alimentação em Unidades de Alimentação e Nutrição, embora os estudos ainda não acompanhem a evolução do setor.

Mesmo levando em conta todas as dificuldades que envolvem as pesquisas dessa natureza, alguns estudos têm sido desenvolvidos em restaurantes institucionais e, em menor proporção, em restaurantes comerciais com relação ao conteúdo e estabilidade de vitaminas, principalmente carotenóides e vitaminas hidrossolúveis (PINHEIRO-SANT'ANA et al, 1998 e 1999a e b; CAMPOS et al., 2003, SÁ e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

No Brasil, nenhum estudo foi encontrado sobre o conteúdo de vitamina E em alimentos e preparações, tanto a nível laboratorial como de UAN's. Considerando que essa vitamina é muito susceptível ao oxigênio, luz e calor, informações dessa natureza possibilitam a avaliação real de consumo (EINTENMILLER, 1997).

Os estudos freqüentemente conduzidos em Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) para avaliação do teor e estabilidade de vitamina E são

freqüentemente relacionados a óleos vegetais utilizados em frituras (HASSAPIDOU et al., 1994; GORDON e KOURIMSKÁ, 1995; BARRERA-ARELLANO et al., 2002).

A degradação de α -tocoferol em óleos utilizados em frituras depende do tipo de óleo, tempo de uso e a temperatura ao qual é submetido. Em geral, perdas variam entre 30 a 60% (SIMONNE e EITENMILLER, 1998; HOLOWNIA et al., 2000; VERLEYEN et al., 2001).

Nenhum estudo foi encontrado acerca da estabilidade de tocoferóis em vegetais, para avaliar perdas que podem ocorrer nos processos de higienização, pré-preparo e cocção dos mesmos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Matéria Prima

Utilizou-se alimentos de origem vegetal e animal comumente preparados em restaurantes comerciais de Viçosa, MG, além de óleos vegetais adquiridos no comércio local. Os alimentos foram selecionados de acordo com o conteúdo de vitamina E indicado pela literatura (aqueles considerados como fontes mais importantes), sendo que para a maior parte das hortaliças analisadas não foi encontrada nenhuma informação específica sobre seu teor de vitamina E.

Dezessete alimentos e/ou preparações fizeram parte deste estudo:

a) Hortaliças (EMBRAPA, 2004):

- Crus: agrião (*Nasturtium officinale*), cebolinha (*Allium schoenoprasum*), espinafre (*Spinacea oleracea*), pimentão verde (*Capsicum annuum*), rúcula (*Eruca sativa*) e salsa (*Petroselinum crispum*);
- Cru e cozido: brócolis (*Brassica oleracea var itálica*);
- Crus e refogados: almeirão (*Hieracium commursonil*) e couve (*Brassica oleracea var acephala*).

b) Alimento de origem animal: Gema de ovo (crua e cozida).

c) Óleos: soja, canola e de oliva.

4.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Para o preparo das amostras utilizou-se os seguintes reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): acetato de etila, hexano e isopropanol da Synth, Brasil; sulfato de sódio anidro da Vetec, Brasil; butilhidroxitolueno (BHT) da Synth, Brasil.

Os padrões vitamínicos utilizados foram os isômeros α -, β -, γ - e δ -tocoferol e tocotrienol, da Calbiochem®, EMD Biosciences, Inc., EUA.

As fases móveis foram preparadas utilizando reagentes grau cromatográfico: hexano e isopropanol da Mallinckrodt, EUA e ácido acético da Merck, Brasil.

Para a filtração das amostras utilizou-se papel de filtro nº JP41 J. Prolab, Brasil; seringas descartáveis esterilizadas de 3 mL, da Rymco, Colômbia; unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45µm de porosidade, da Millipore, Brasil.

4.1.3. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados para extração da vitamina nas amostras: microtritador, modelo MA 102, Marconi; bomba de vácuo modelo CA Fanen; evaporador rotativo Q-344.1, Quimis;

As fases móveis foram degaseificadas em vibrador ultrassônico T-14 Odontobrás.

Para varredura dos espectros de absorção dos padrões vitamínicos foi utilizado espectrofotômetro UV 1601, Shimadzu.

Para a determinação de sólidos totais, utilizou-se estufa de circulação forçada de ar, Fanen 320-SE e balança analítica, Ohaus Explorer.

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba de alta pressão, modelo LC-10AD VP; injetor automático SIL-10AF com alça de amostragem de até 50µL; coluna LiChrosorb 5µ Si60 Phenomenex 250 x 4 mm; detector de fluorescência modelo RF-10A XL; software "Multi System" modelo Class VP 6.1.

4.2. Métodos

4.2.1. Restaurantes Colaboradores

Nove restaurantes comerciais localizados na região central da cidade de Viçosa foram pré-selecionados e contatados, para colaborar com o levantamento sobre alimentos e preparações freqüentemente oferecidos nestes locais. Considerando os hábitos alimentares da região, a semelhança dos procedimentos operacionais e a periodicidade de entrada dos alimentos

selecionados no cardápio, dois restaurantes foram escolhidos e convidados a colaborar com este estudo, após o esclarecimento dos seus objetivos. Em seguida, acompanhou-se as etapas de pré-preparo e preparo dos alimentos selecionados nestes estabelecimentos para registro de variáveis de tempo e temperatura empregados em cada processo.

4.2.2. Condições de Preparação e Coleta dos Alimentos

Os alimentos foram preparados nos restaurantes selecionados de acordo com os métodos de rotina utilizados em cada local, possibilitando a análise do conteúdo vitamínico em condições reais de preparação e consumo. Os métodos de armazenamento, higienização, pré-preparo e preparo utilizados nos restaurantes estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Uma vez preparados, amostras dos alimentos foram coletadas, embaladas em sacos plásticos e papel alumínio, identificadas e levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em geladeira sob temperatura de 0°C a +5°C até o momento da extração e análise.

Após a coleta das amostras, todo o processo de análise, ou seja, extração dos compostos vitamínicos, análise cromatográfica e determinação dos sólidos totais, foi realizado em um período máximo de cinco dias. A etapa de extração foi concluída nos dois primeiros dias.

É importante destacar a dificuldade enfrentada na coleta de amostras, durante o período de análise. Vegetais folhosos como espinafre, almeirão e brócolis, de uso menos freqüente nos restaurantes selecionados e mais susceptíveis ao período de chuvas, nem sempre estavam disponíveis para a compra no mercado. Conseqüentemente, não eram preparados nos estabelecimentos apesar de fazer parte da composição do cardápio corrente. Além disso, a padronização dos cardápios e dos procedimentos de preparação nos restaurantes ainda é pequena, gerando uma dificuldade adicional na coleta das amostras que prejudicou o cumprimento do cronograma das análises.

Tabela 3. Condições de armazenamento e higienização de hortaliças e ovos nos restaurantes comerciais colaboradores.

Alimento	Restaurantes	
	1	2
Agrião, Almeirão, Cebolinha, Couve, Espinafre, Rúcula e Salsa.	Recebimento no dia da utilização; Armazenado em recipientes de polietileno até o momento da higienização (aproximadamente 4 horas), em temperaturas em torno de 20 a 30°C; Higienização apenas com água corrente.	Recebimento no dia da utilização; Armazenado em recipientes de polietileno até o momento da higienização (aproximadamente 3 horas), em temperaturas em torno de 20 a 30°C; Higienização apenas com água corrente.
Pimentão Verde	Armazenado em temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas; Higienização com água corrente; Refrigerado a 10°C após pré-preparo por aproximadamente 16 horas.	Armazenado em temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas; Higienização com água corrente; Refrigerado a 8°C após pré-preparo por aproximadamente 4 horas.
Brócolis	Armazenado sob temperatura de refrigeração (em torno de 10°C); Higienização por imersão em água; Refrigerado a 8°C após pré-preparo por aproximadamente 2 horas.	Armazenado sob temperatura de refrigeração (em torno de 8°C); Higienização por imersão em água e lavagem em água corrente; Refrigerado a 8°C após pré-preparo por aproximadamente 4 horas.
Ovos	Armazenado sob temperatura ambiente por aproximadamente 72 horas; Higienização com água corrente.	Armazenado sob temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas; Higienização com água corrente.

Tabela 4. Condições de preparo de hortaliças e ovos nos restaurantes comerciais colaboradores.

Alimento	Restaurantes	
	1	2
Agrião, Espinafre e Rúcula	Retirada de partes não-comestíveis (caules); armazenados em temperatura ambiente até o momento de servir (aproximadamente 2 horas).	Retirada de partes não-comestíveis (caules); armazenados sob temperatura ambiente até o momento de servir (aproximadamente 3 horas).
Cebolinha, Salsa e Pimentão Verde	Retirada de partes não-comestíveis e fatiamento em cortes comuns de uso (rodela, tiras e cubos, para cebolinha, salsa e pimentão, respectivamente); armazenamento a temperatura ambiente até o momento de utilização em outra preparação ou salada (aproximadamente 4 horas).	Retirada de partes não-comestíveis e fatiamento em cortes comuns de uso (rodela, tiras e cubos, para cebolinha, salsa e pimentão, respectivamente); armazenamento sob refrigeração (8°C) até o momento de utilização em preparações ou salada (aproximadamente 5 horas).
Almeirão e Couve	Retirada de partes não-comestíveis e fatiamento em tiras; armazenamento em temperatura ambiente até o momento do preparo; Refogado em óleo por 3 minutos.	Retirada de partes não-comestíveis e fatiamento em tiras; armazenamento sob refrigeração (8°C) até o momento do preparo; Refogado em óleo em temperatura por 2 minutos.
Brócolis	Retirada de partes não-comestíveis e armazenamento em temperatura ambiente até o momento do preparo; Cozido sob imersão em água (100°C) por aproximadamente 35 minutos.	Retirada de partes não-comestíveis e armazenamento em temperatura ambiente até o momento do preparo; Cozido sob imersão em água (100°C) por aproximadamente 20 minutos.
Ovos	Cozido sob imersão em água (100°C) por aproximadamente 25 minutos.	Cozido sob imersão em água (100°C) por aproximadamente 15 minutos.

Para a análise do conteúdo vitamínico em óleos, os mesmos foram adquiridos no comércio local e as determinações conduzidas em três repetições. Para uma melhor representatividade da análise, tomou-se o cuidado de adquirir unidades dos óleos que fossem da mesma marca, porém, provenientes de diferentes lotes de fabricação.

4.2.3. Determinação das Condições de Extração dos Compostos Vitamínicos

Para a extração dos compostos da vitamina E, diferentes métodos descritos na literatura foram testados e avaliados de acordo com a resposta obtida na separação (resolução) e quantificação dos compostos por CLAE.

Métodos envolvendo saponificação utilizando diferentes combinações de tempo, temperatura e concentração de hidróxido de potássio (KOH), além de técnica de extração direta com solventes, foram avaliados para a análise dos compostos neste estudo.

4.2.4. Determinação das Condições Cromatográficas

A eficiência da separação cromatográfica dos oito compostos da vitamina E foi avaliada a partir de testes com diferentes proporções dos componentes da fase móvel, vazão de fluxo e comprimento de onda de maior sensibilidade do detector, de acordo com condições sugeridas pela literatura. Para isso, utilizou-se a CLAE e um sistema de fase normal, para maior facilidade na separação dos isômeros, especialmente dos pares γ - e β - tocoferóis.

A identificação dos compostos foi feita a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos para padrões e amostras, analisados sob as mesmas condições, além da comparação dos resultados quantitativos observados com a literatura, para verificar coerência dos dados. A análise quantitativa da vitamina foi realizada utilizando-se padronização externa.

4.2.5. Otimização do Método de Preparo das Amostras e das Condições de Análise por CLAE

4.2.5.1. Extração dos Compostos Vitamínicos

Os procedimentos testados para a extração dos compostos durante a etapa de otimização da preparação das amostras para a análise cromatográfica estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de extração avaliadas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE.

Condições de Extração	Análise Original	Referência
Saponificação sob aquecimento <ul style="list-style-type: none"> • Uso de KOH 60%, à 70°C por 50 minutos • Extração com etanol e hexano 	Determinação de α - e γ -tocoferol e tocotrienol em tomate e brócolis	LEE et al., 2000.
Saponificação à temperatura ambiente <ul style="list-style-type: none"> • Uso de KOH 50%, em temperatura ambiente, <i>overnight</i>. • Extração com etanol e hexano 	Determinação de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, frutas e dietas.	PIIRONEN et al., 1984 e 1986.
Extração direta com solventes <ul style="list-style-type: none"> • Uso de isopropanol e mistura solvente composta por hexano e acetato de etila (85:15, v/v). 	Determinação de tocoferóis em cereais infantis extrusados.	LEE et al., 1999.

Por apresentar os melhores resultados neste trabalho, o método envolvendo extração direta com solvente foi utilizado para a extração dos isômeros da vitamina E, conforme descrito a seguir.

O procedimento de extração (baseado em LEE et al., 1999) envolveu a extração dos isômeros, evaporação dos solventes e a redissolução para volume conhecido. Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

- Pesou-se em torno de 10 gramas de amostra (em balança analítica com 4 casas decimais);
- Em seguida, adicionou-se 4 mL de água deionizada aquecida (aproximadamente 80°C), cerca de 5 gramas de sulfato de sódio anidro e misturou-se com espátula;

- Acrescentou-se 10 mL de isopropanol e 1 mL de hexano contendo 0,05% de BHT . Após a adição de 25 mL de mistura solvente (hexano: acetato de etila, 85:15, v/v), as amostras foram trituradas utilizando microtritador em velocidade média, durante 1 minuto;
- Uma vez trituradas, as amostras foram filtradas a vácuo, utilizando papel de filtração rápida;
- Lavou-se o resíduo retido pela filtração com 15 mL de mistura solvente. Em seguida, transferiu-se o mesmo para o tubo de trituração e a etapa de extração foi repetida adicionando-se 5 mL de isopropanol e 30 mL de mistura solvente, com posterior homogeneização e filtração a vácuo;
- O resíduo foi novamente lavado com 5 mL de mistura solvente;
- Transferiu-se o filtrado para um balão e evaporou-se os solventes em rotavapor, utilizando temperatura de 70°C.
- Em seguida, dissolveu-se as amostras em mistura solvente e transferiu-se quantitativamente o líquido para balões volumétricos de 25 mL, sendo o volume completado com mistura de hexano e acetato de etila (85:15, v/v);
- Após a completa homogeneização no balão volumétrico, tomou-se uma alíquota de 5mL e evaporou-se em nitrogênio gás, armazenando-se em vidros âmbar hermeticamente vedados sob temperaturas de -5º a 0ºC, até o momento da análise cromatográfica.

Todas as operações foram efetuadas ao abrigo da luz natural e fluorescente, utilizando-se vidraria de cor âmbar ou proteção com papel alumínio.

A análise dos óleos não necessitou da etapa de extração, uma vez que os mesmos foram apenas diluídos em hexano (0,1g da amostra em 10 mL de hexano) e injetados diretamente na coluna para análise (adaptado de DIONISI et al., 1995).

4.2.5.2. Preparo dos Padrões Vitamínicos

Isômeros α -, β -, γ - e δ - tocoferóis e tocotrienóis foram utilizados para o preparo dos padrões. Soluções estoques de cada um dos oito compostos

foram preparadas a partir da pesagem de 5 mg de cada padrão, que foram dissolvidos em hexano contendo 0,01% de BHT e o volume completado para 100 mL, obtendo-se concentrações em torno de 50 µg/mL.

Para análise cromatográfica e quantificação dos compostos, foram realizadas diluições apropriadas da solução estoque a fim de se obter concentrações comparáveis aos teores encontrados nas amostras. Para isso, preparou-se soluções contendo a mistura dos oito isômeros em diferentes concentrações, conforme descrito a seguir:

- Solução Padrão 1 - Concentração teórica de 5 µg/mL de cada isômero: 2,5 mL da solução estoque de cada composto foram pipetados, adicionados em balão volumétrico, dissolvidos e completados para 25 mL com hexano contendo 0,01% de BHT;
- Solução Padrão 2 - Concentração teórica de 2,5 µg/mL: 5 mL da Solução Padrão 1 foram pipetados, adicionados em balão volumétrico, dissolvidos e completados para 10 mL com hexano contendo 0,01% de BHT;
- Solução Padrão 3 - Concentração teórica de 0,5 µg/mL: 1 mL da Solução Padrão 1 foram pipetados, adicionados em balão volumétrico, dissolvidos e completados para 10 mL com hexano contendo 0,01% de BHT.

As concentrações de todas as soluções padrão foram corrigidas de acordo com a pureza de cada isômero, que por sua vez foi monitorada pelos valores de coeficiente de absorvidade molar ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) correspondentes e de absorvância mensurados em espectrofotômetro. Para cálculo da concentração real do padrão e, conseqüentemente da pureza, utilizou-se a seguinte equação:

$$C_{\text{Real}} (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorvância máxima} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$$

A Tabela 6 apresenta os coeficientes de absorvidade específicos e os comprimentos de onda (λ) utilizados para a determinação da concentração real dos padrões.

Tabela 6. Coeficientes de absorvidade molar específicos e comprimentos de onda máximos para tocoferóis em solução de etanol a 96%.

Compostos	λ_{\max} nm	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$
α - Tocoferol	294	70,8
β - Tocoferol	297	86,4
γ - Tocoferol	298	92,8
δ - Tocoferol	298	91,2

Fonte: Scott (1978) citado por Lee et al., 1999.

Uma vez que os valores específicos para tocotrienóis não são encontrados na literatura, utilizou-se os coeficientes de absorvidade molar e os comprimentos de onda máximos de cada isômero tocoferol correspondente para cálculo da concentração real do α -, β -, γ - e δ -tocotrienol, como indicado por PIIRONEN et al. (1984). A determinação da pureza foi feita a partir da leitura espectrofotométrica de soluções-padrão preparadas em etanol a 96% e os dados foram extendidos para as soluções utilizadas em hexano.

Os resultados obtidos a partir da injeção cromatográfica de volumes crescentes dos diferentes padrões foram utilizados para construção da curva-padrão de cada composto. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada composto. A equação de regressão linear obtida para cada isômero foi utilizada para quantificar o conteúdo vitamínico nas amostras de alimentos estudadas.

4.2.5.3. Determinação dos Compostos Vitamínicos

A otimização da separação e a detecção dos oito isômeros foram realizadas a partir de testes com diferentes condições cromatográficas, conforme descrito na Tabela 7. A escolha dos componentes da fase móvel e dos comprimentos de onda de excitação e emissão foi feita considerando a utilização de sistema de fase normal e condições descritas na literatura em trabalhos com análises semelhantes (ABIDI, 2000; RUPÉREZ et al., 2001). Na maior parte dos casos, a separação dos isômeros γ -tocoferol e β -

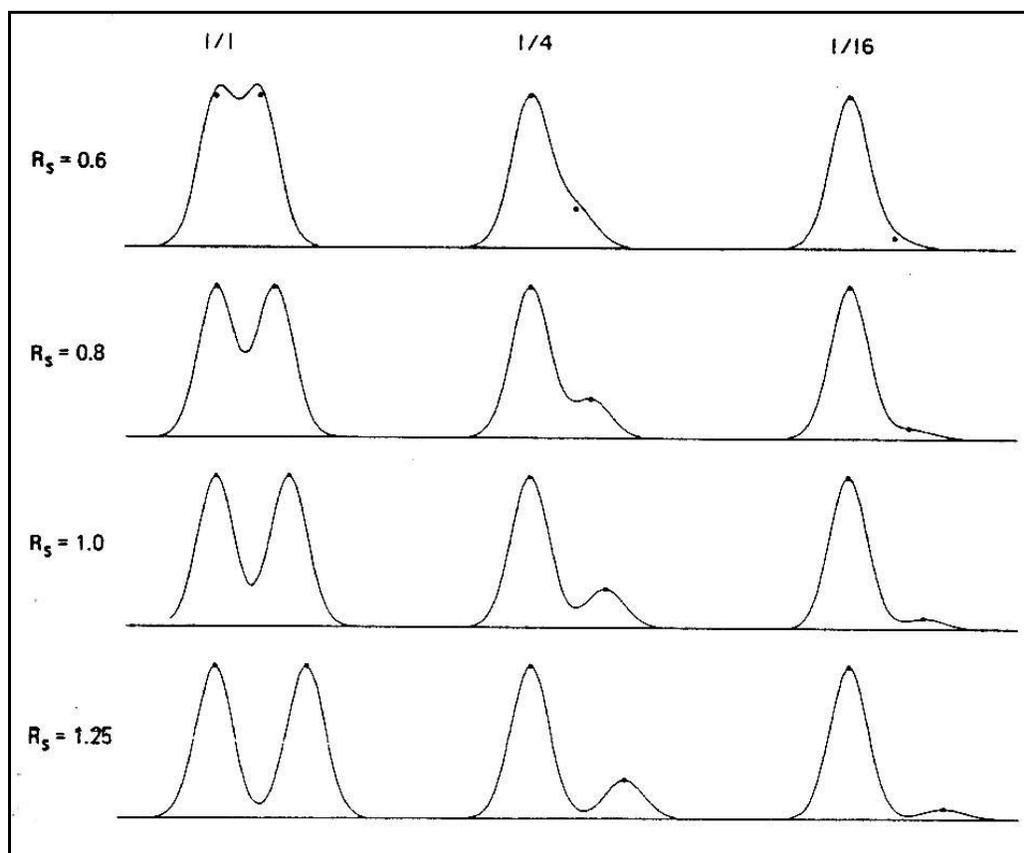
tocotrienol foi o parâmetro determinante para avaliação das condições testadas.

Tabela 7. Condições cromatográficas testadas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças e ovos por CLAE.

Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	λ de Excitação e Emissão (nm)	Referência
HX	1,0	290 e 330	ABIDI, 2000; RUPÉREZ et al., 2001
HX:IP (99:1)	1,0	285 e 325	INDYK, 1988; ABIDI, 2000.
HX:IP (99,1: 0,9)	1,0	285 e 325	LEE et al., 1999; ABIDI, 2000
HX:IP (99,4: 0,6)	1,0	290 e 330	ABIDI, 2000.
HX:IP (99,4: 0,6)	1,5	285 e 325	ABIDI, 2000; RUPÉREZ et al., 2001
HX:IP (99,5: 0,5)	1,0	290 e 330	CHEN et al., 1998; ABIDI, 2000.
HX:IP (99,7: 0,3)	1,0	290 e 330	DIONISI et al., 1995; ABIDI, 2000.
HX:IP (99,7: 0,3)	1,5	285 e 325	ABIDI, 2000; RUPÉREZ et al., 2001
HX:IP:HAC (99,35: 0,6: 0,05)	1,0	290 e 330	ABIDI, 2000.
HX:IP:HAC (99,33: 0,6: 0,07)	1,0	290 e 330	ABIDI, 2000.
HX:IP:HAC (99,33: 0,6: 0,07)	1,0	285 e 325	ABIDI, 2000.
HX:IP:HAC (99,33: 0,6: 0,07)	1,5	290 e 330	ABIDI, 2000.
HX:IP:HAC (99,33: 0,6: 0,07)	2,0	290 e 330	ABIDI, 2000.

HX: Hexano IP: Isopropanol HAC: Ácido Acético

A resolução dos compostos foi avaliada segundo Snyder e Kirkland (1979), especialmente a separação entre γ -tocoferol e β -tocotrienol, que foi avaliada segundo os coeficientes de resolução (R_s) como mostrado na Figura 3.



(R_s) = 0,6 (ruim); 0,8 (insuficiente); 1,0 (suficiente); 1,25 (muito bom)

Fonte: SNYDER e KIRKLAND, 1979.

Figura 3. Separação de compostos por CLAE de acordo do coeficiente de resolução (R_s).

As análises dos compostos vitamínicos foram conduzidas utilizando-se a condição cromatográfica que apresentou o melhor resultado. Assim, as condições selecionadas incluíram: coluna LiChrosorb 5 μ Si60, com 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno; detecção por fluorescência a 290 nm de excitação e 330 nm de emissão; fase móvel composta de hexano/isopropanol/ácido acético (99,33:0,6:0,07), com vazão de 1 mL/minuto.

Após extração, as alíquotas das amostras secas em nitrogênio foram redissolvidas em 2 mL hexano e filtradas através de unidades filtrantes com porosidade de 0,45 μ m. As análises foram realizadas injetando-se de 1 a 30 e 50 μ L dos diferentes padrões e de dois volumes diferentes para cada

amostra, a fim de se obter a detecção de todos os compostos em quantidades apropriadas para a identificação e quantificação. Dessa forma, injetou-se 5 µL para análise do α -tocoferol, uma vez que o mesmo excedia a capacidade de detecção em praticamente todas as amostras em volumes maiores; e 50 µL, para detecção dos demais compostos que ocorrem em menor concentração.

A injeção dos óleos na coluna cromatográfica foi realizada após diluição de 0,1g da amostra em 10 mL de hexano, seguida por filtração em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm (adaptado de SYVÄÖJA et al., 1986; DIONISI et al., 1995).

4.2.5.4. Determinação da Faixa de Linearidade

A faixa de linearidade foi obtida utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas anteriormente, a partir da injeção, em triplicata, de volumes crescentes (1 a 50 µL) da solução padrão. Desse modo, conseguiu-se resultados de uma faixa ampla de concentrações dos padrões, a partir dos quais a linearidade foi determinada. Para isso, efetuou-se uma análise de regressão linear utilizando os valores das áreas dos picos e suas concentrações correspondentes, para cada composto. O coeficiente de correlação (R^2) obtido em cada caso foi utilizado para avaliação da linearidade (ALBALÁ-HURTADO et al., 1997).

4.2.5.5. Análise da Recuperação dos Padrões

Uma vez otimizados todos os procedimentos para extração e análise dos compostos vitamínicos, testes de recuperação dos padrões foram efetuados a partir da adição de concentrações conhecidas dos compostos em amostras de agrião, rúcula, pimentão e salsa.

Para a avaliação e determinação da recuperação, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e pesadas em dois tubos, de forma a obter duas alíquotas bem semelhantes. A uma das amostras, adicionou-se padrões em concentrações suficientes para representar cerca de 50% do conteúdo vitamínico original de cada vegetal analisado, sendo o outro tubo

utilizado como controle. Em seguida, os dois tubos de cada amostra foram submetidos aos processos de extração e análise. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e as amostras injetadas em duplicata. Os valores de recuperação foram obtidos a partir da diferença percentual entre os teores analisados e adicionados.

4.2.5.6. Análise Estatística dos Resultados

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial, cujos fatores foram dois restaurantes, dez tipos de alimentos e três repetições. As amostras de almeirão, brócolis, couve e ovo foram coletadas cruas e cozidas/refogadas.

Para a comparação de médias do teor dos compostos nos alimentos entre os dois restaurantes, aplicou-se o teste de *t Student*, a nível de 5% de probabilidade ($\alpha=5\%$).

Para a avaliação do efeito dos restaurantes sobre os teores vitamínicos de diferentes alimentos e para a comparação das médias dos teores dos alimentos, agrupou-se os mesmos em “folhosos” (agrião, almeirão cru, couve crua, espinafre e rúcula) e “temperos” (cebolinha, salsa e pimentão). Foi realizada então uma análise de variância, cujo modelo seguiu o esquema da Tabela 8.

Para a comparação de médias dos valores dos compostos entre os alimentos de cada grupo, aplicou-se o teste de amplitude múltiplas de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System).

Tabela 8. Análise de variância do teor vitamínico de hortaliças e ovos utilizados em restaurantes comerciais.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	
	Folhosos	Temperos
Restaurante (R)	1	1
Alimento (A)	4	2
R * A	4	2
Resíduo	-	-

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do Método de Extração dos Compostos Vitamínicos

Os resultados das análises por CLAE mostraram que o uso de cerca de 10 gramas de cada amostra foi suficiente para originar cromatogramas adequados para a identificação e quantificação dos oito isômeros da vitamina E.

Dos três métodos de extração testados, a extração direta da vitamina com solventes orgânicos apresentou os melhores resultados, tanto em relação à separação dos oito isômeros, especialmente os compostos γ -tocoferol e β -tocotrienol, quanto aos valores analíticos detectados para a área do pico dos compostos, como mostrado na Tabela 9. A otimização deste método para análise de tocoferóis e tocotrienóis em vegetais, ovos e óleos foi considerada um avanço, uma vez que se baseou em um método original para determinação, apenas, de tocoferóis em cereais infantis extrusados.

Tabela 9. Avaliação das condições de extração para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE.

Condições de Extração	Resolução dos Compostos ¹	Valores Analíticos ²
Saponificação sob aquecimento	+	- - -
Saponificação à temperatura ambiente	+	-
Extração direta com solventes	+++	+++

¹ (Rs): - - - (Rs < 0,6); - (Rs = 0,6); + (Rs= 0,7 a 0,8); ++ (Rs=0,9); +++ (Rs= 1,0 a 1,25)

Rs: 0,6 (ruim); 0,8 (insuficiente); 1,0 (suficiente); 1,25 (muito bom)

² Valores das áreas dos picos observados: - - - valores inferiores; - - valores intermediários; +++ valores superiores

Fonte: SNYDER e KIRKLAND, 1979.

Observa-se que, embora os métodos de extração envolvendo saponificação não tenham interferido de forma importante na separação cromatográfica, os mesmos foram determinantes na preservação dos

isômeros. Isso significa que, para as amostras analisadas neste trabalho, a etapa de saponificação independente da temperatura e tempo aplicados exerceu efeito destrutivo sobre o conteúdo de vitamina E, semelhante às observações feitas em estudos anteriores (LEE et al., 1999; De Leenheir et al. (1979) citado por RUPÉREZ et al., 2001).

De fato, a saponificação envolve o uso de reagentes danosos às vitaminas de modo geral, sendo que a vitamina E apresenta susceptibilidade variável devido à resistência diferenciada de cada isômero (LEE et al., 2000). Compostos mais sensíveis à saponificação, como o δ -T, δ -T3 e γ -T (UEDA e IGARASHI,1990), foram totalmente degradados nos testes que empregaram essa etapa, enquanto que a extração direta permitiu que os mesmos fossem preservados e detectados em níveis quantificáveis.

5.2. Determinação da Pureza dos Padrões

Para uma quantificação adequada do teor vitamínico nas amostras, foi necessário verificar a pureza dos padrões dos oito isômeros. A Tabela 10 apresenta os valores referentes ao monitoramento da pureza em soluções preparadas a partir dos padrões adquiridos.

Tabela 10. Comprimento de onda máximo, absorvância e pureza dos padrões de tocoferóis e tocotrienóis em solução de etanol 96%.

Padrão	λ_{\max} (nm)	Absorvância (A)	Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (%)
α -T	292	0,380	53,67	55,00	97,58
β -T	295,5 – 296,5	0,477	55,21	57,00	96,86
γ -T	297 – 298	0,475	52,08	57,00	91,37
δ -T	297 – 298	0,468	50,23	56,00	90,05
α -T3	289,5 – 291	0,343	48,45	54,00	89,72
β -T3	296	0,447	51,74	56,00	92,39
γ -T3	298,5 – 299,5	0,497	53,56	57,00	93,86
δ -T3	297 – 298,5	0,484	53,07	56,00	94,77

α (alfa); β (beta); γ (gama); e δ (delta); T (tocoferol) e T3 (tocotrienol).

Observa-se que todos os oito padrões apresentaram altos níveis de pureza. No entanto, a não correção das concentrações teóricas poderia implicar em erros na quantificação dos compostos das amostras. As concentrações reais das soluções utilizadas neste estudo são mostradas na Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações reais dos padrões utilizados para quantificação dos compostos vitamínicos, corrigidos segundo a pureza.

Padrão	Solução Estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Solução Padrão 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Solução Padrão 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Solução Padrão 3 ($\mu\text{g/mL}$)
α -T	51,7174	5,1717	2,5859	0,5172
β -T	52,3044	5,2304	2,6152	0,5230
γ -T	48,4261	4,8426	2,4213	0,4843
δ -T	47,7265	4,7726	2,3863	0,4773
α -T3	46,6544	4,6654	2,3327	0,4665
β -T3	50,8145	5,0814	2,5407	0,5081
γ -T3	51,6780	5,1678	2,5839	0,5168
δ -T3	51,1758	5,1176	2,5588	0,5118

α (alfa); β (beta); γ (gama); e δ (delta); T (tocoferol) e T3 (tocotrienol).

5.3. Otimização das Condições Cromatográficas

A avaliação qualitativa da interferência das condições cromatográficas na separação dos isômeros, especialmente γ -tocoferol e β -tocotrienol, em amostras de hortaliças e gema de ovos está apresentada na Tabela 12. De acordo com os resultados, observa-se que fases móveis freqüentemente utilizadas em estudos semelhantes, compostas principalmente por hexano e ou isopropanol, não foram eficientes (resoluções $\leq 0,6$) em promover uma separação satisfatória desses dois compostos. A separação somente foi obtida, na coluna utilizada neste estudo, quando pequenas concentrações de ácido acético foram incorporadas à fase móvel, como indicado por Shin e Godber (1993).

Dentre as proporções testadas, a fase móvel composta por hexano: isopropanol: ácido acético (99,33: 0,6: 0,07) apresentou os melhores

resultados em termos de eficiência de separação dos compostos de interesse. Cabe salientar que, a separação entre os dois compostos de interesse só foi considerada satisfatória com a adição de ácido acético à fase, mesmo em pequenas concentrações. Shin e Godber (1983) mencionaram em seu trabalho que o ácido acético favorece a estabilidade da coluna de sílica e, portanto, pode auxiliar no processo de resolução. Considerando a combinação dos demais parâmetros avaliados, os comprimentos de onda de detecção a 290 nm para emissão e 330 nm para excitação, além de uma vazão de fluxo da fase móvel de 1mL/minuto, foram condições que permitiram que a separação dos compostos fosse mantida e proporcionaram níveis superiores de detecção por fluorescência.

Tabela 12. Avaliação das condições cromatográficas para determinação de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de hortaliças e ovos por CLAE.

Condições Cromatográficas	Resolução γ -T e β -T3
HX; 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	- - -
HX:IP (99:1); 1mL/min; λ_{Ex} 285 e λ_{Em} 325 nm	- - -
HX:IP (99,1: 0,9); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	- - -
HX:IP (99,4: 0,6); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	-
HX:IP (99,4: 0,6); 1,5mL/min; λ_{Ex} 285 e λ_{Em} 325 nm	- - -
HX:IP (99,5: 0,5); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	-
HX:IP (99,7: 0,3); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	-
HX:IP (99,7: 0,3); 1,5mL/min; λ_{Ex} 285 e λ_{Em} 325 nm	- - -
HX:IP: HAC (99,35: 0,6: 0,05); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	+
HX:IP: HAC (99,33: 0,6: 0,07); 1mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	++ +
HX:IP: HAC (99,33: 0,6: 0,07); 1mL/min; λ_{Ex} 285 e λ_{Em} 325 nm	+
HX:IP: HAC (99,33: 0,6: 0,07); 1,5mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	-
HX:IP: HAC (99,33: 0,6: 0,07); 2,0mL/min; λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm	-

¹ (Rs): - - - (Rs < 0,6); - (Rs = 0,6); + (Rs= 0,7 a 0,8); ++ (Rs=0,9); +++ (Rs= 1,0 a 1,25)

Rs: 0,6 (ruim); 0,8 (insuficiente); 1,0 (suficiente); 1,25 (muito bom)

Fonte: SNYDER e KIRKLAND, 1979.

A coluna de sílica utilizada neste estudo promoveu uma boa separação dos isômeros γ -tocoferol e β -tocotrienol, o que está coerente com o relatado na literatura para o mesmo tipo de fase estacionária (ABIDI, 2000; KAMAL-ELDIN et al., 2000; PYKA et al., 2001). A resolução obtida (entre 1,0 e 1,25) foi considerada suficiente para a quantificação dos dois compostos com confiabilidade (SNYDER e KIRKLAND, 1979).

No entanto, observou-se uma grande variabilidade nos tempos de corrida durante a otimização das condições cromatográficas, o que fez com que esta etapa fosse a de conclusão mais demorada. Essa variação, embora em menores níveis, continuou presente na fase de análise das amostras, o que resultou em diferenças nos tempos de retenção obtidos para as mesmas. DIONISI et al. (1995) levantaram essa questão em seu trabalho, afirmando que o sistema de fase normal apresenta a grande desvantagem de baixa reprodutibilidade de tempos de retenção, além do equilíbrio da coluna e do tempo de análise serem mais demorados.

5.4. Análise Qualitativa da Vitamina E

A Figura 4 apresenta um perfil cromatográfico típico obtido para a mistura das soluções-padrão dos oito isômeros da vitamina E. A eluição dos compostos na coluna e fase móvel utilizadas seguiu a ordem característica e já bem estabelecida pela literatura para análises utilizando sistema de fase normal, a saber: α -T \rightarrow α -T3 \rightarrow β -T \rightarrow γ -T \rightarrow β -T3 \rightarrow γ -T3 \rightarrow δ -T \rightarrow δ -T3 (ABIDI, 2000).

As Figuras 5 a 18 mostram cromatogramas típicos das amostras analisadas neste trabalho. Verifica-se que o método de preparo das amostras, embora não tenha promovido uma purificação excelente dos extratos, permitiu a perfeita identificação e quantificação dos compostos de interesse.

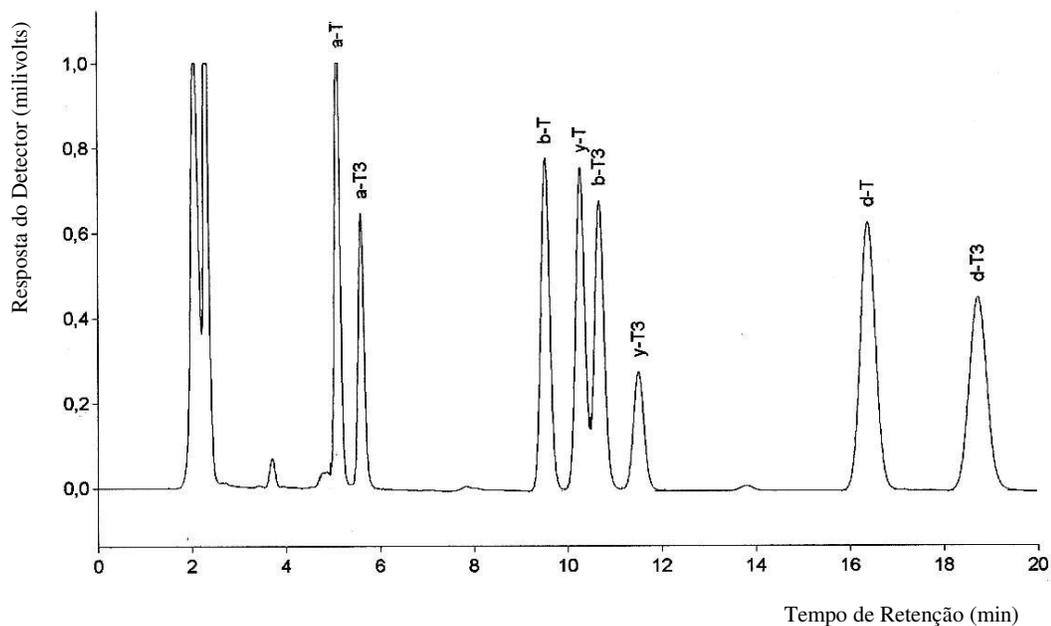


Figura 4. Análise por CLAE da **mistura de padrões** de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3). (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: Fase móvel: 99,35% de hexano + 0,6% de isopropanol + 0,07% de ácido acético; coluna Lichrosorb Si60; detecção por fluorescência (λ_{Ex} 290 e λ_{Em} 330 nm) , vazão 1mL/min; injeção 20 μ L.

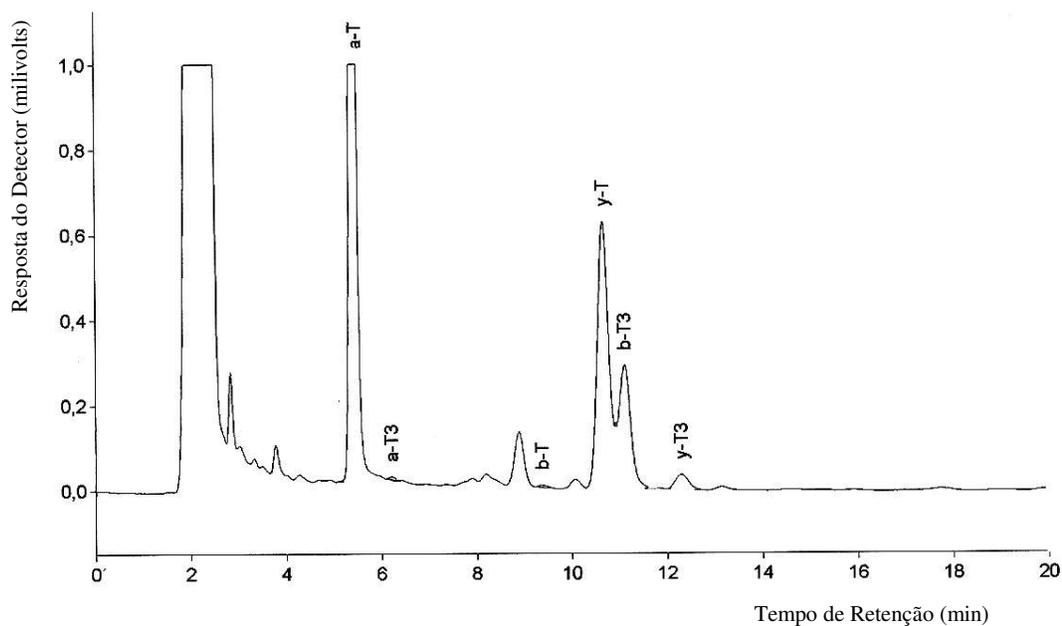


Figura 5. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **agrião**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

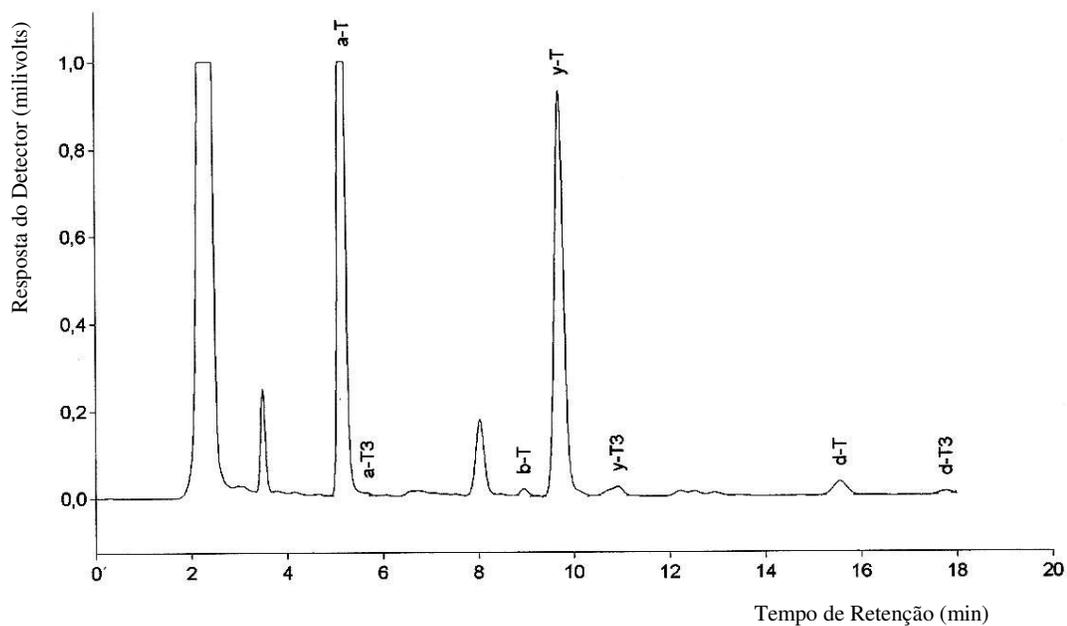


Figura 6. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **almeirão cru**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

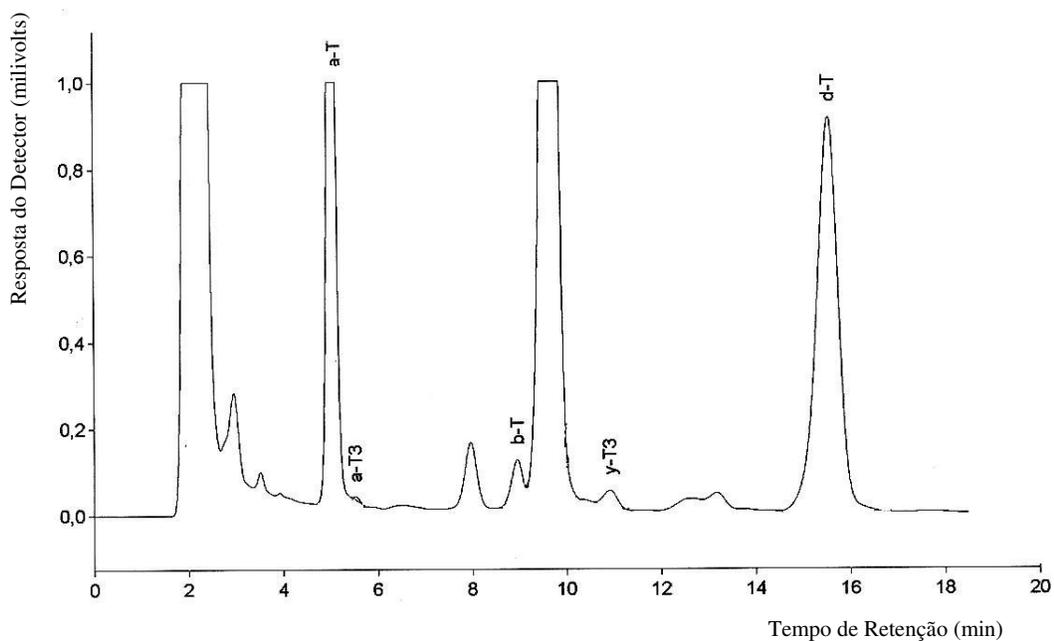


Figura 7. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **almeirão refogado**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção: 5 μ L.

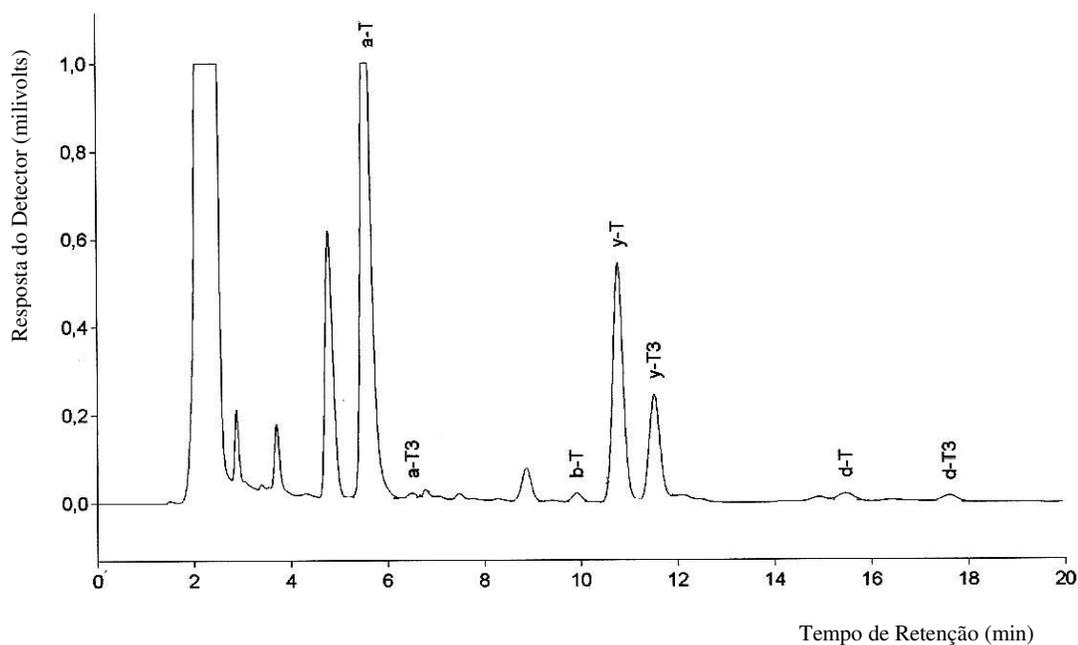


Figura 8. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **brócolis cru**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

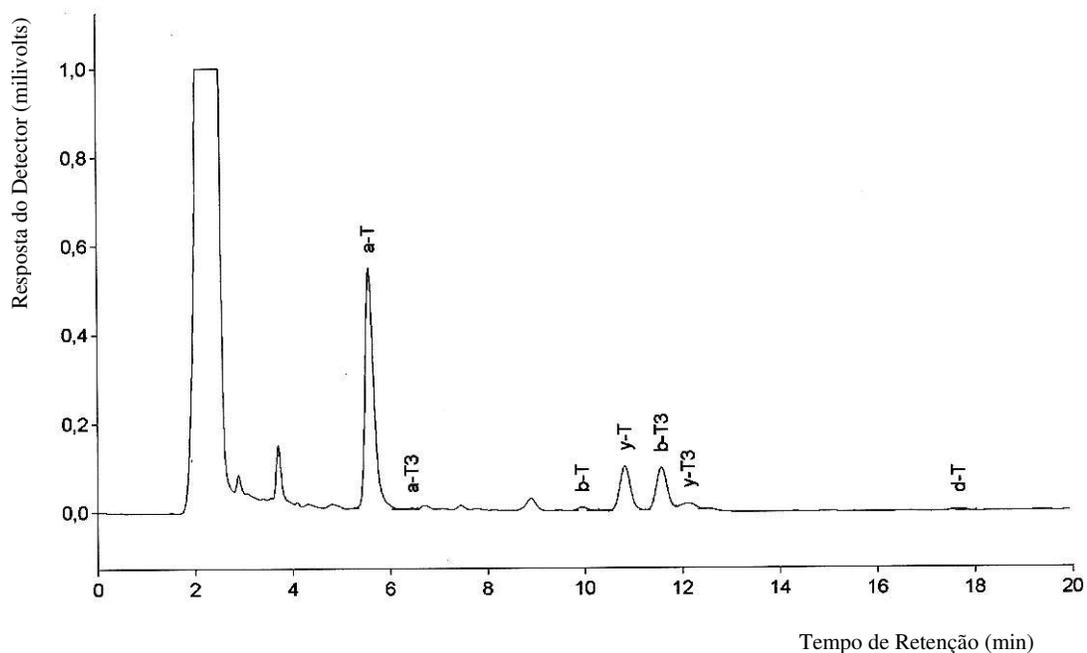


Figura 9. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **brócolis cozido**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

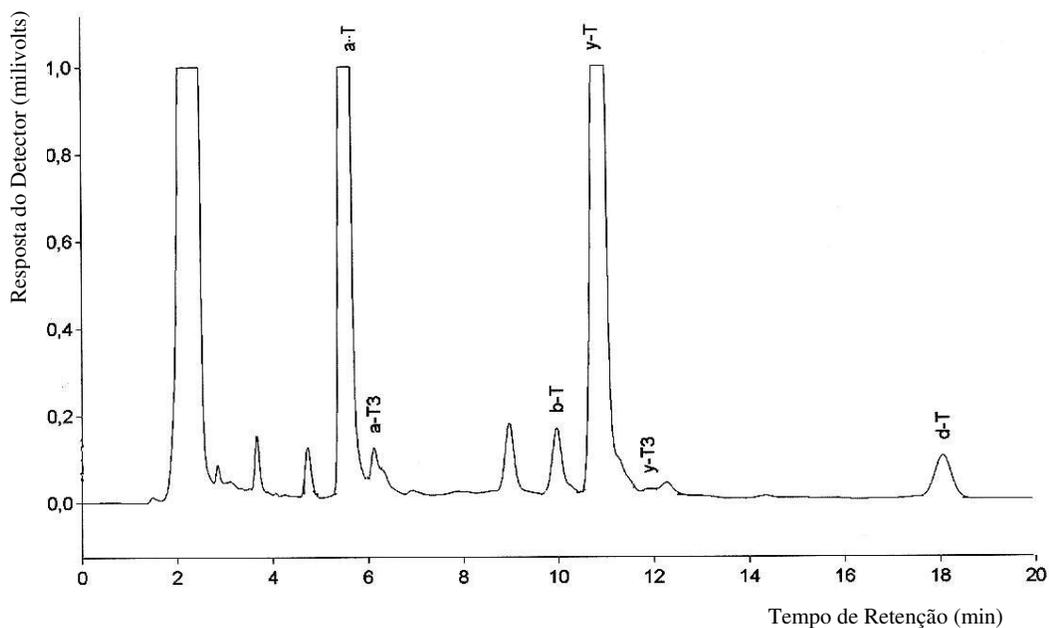


Figura 10. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **couve crua**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

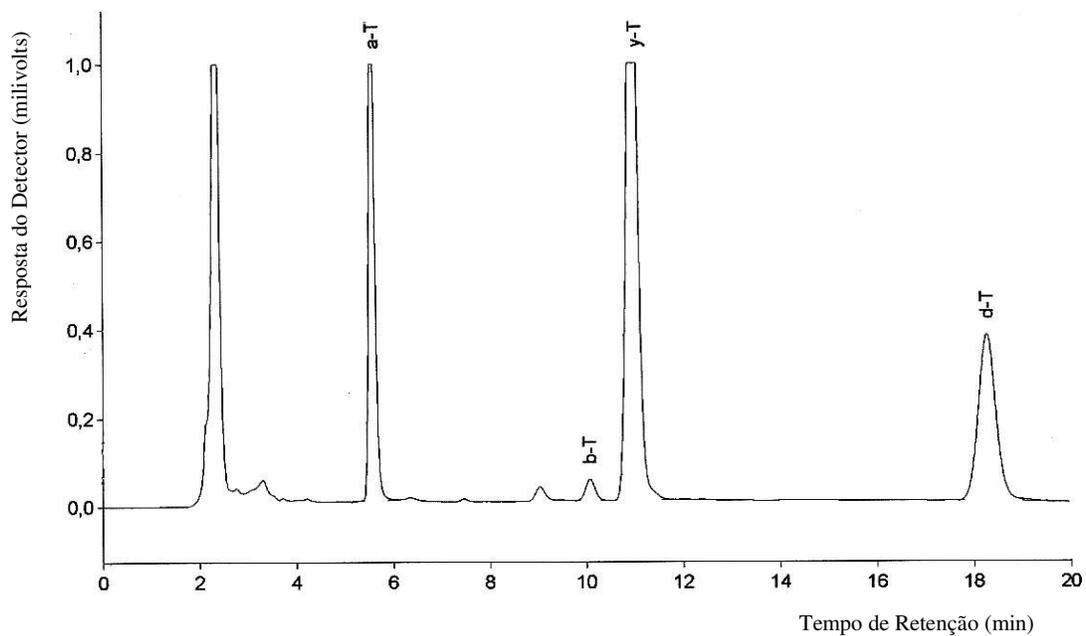


Figura 11. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **couve refogada**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 4 μ L.

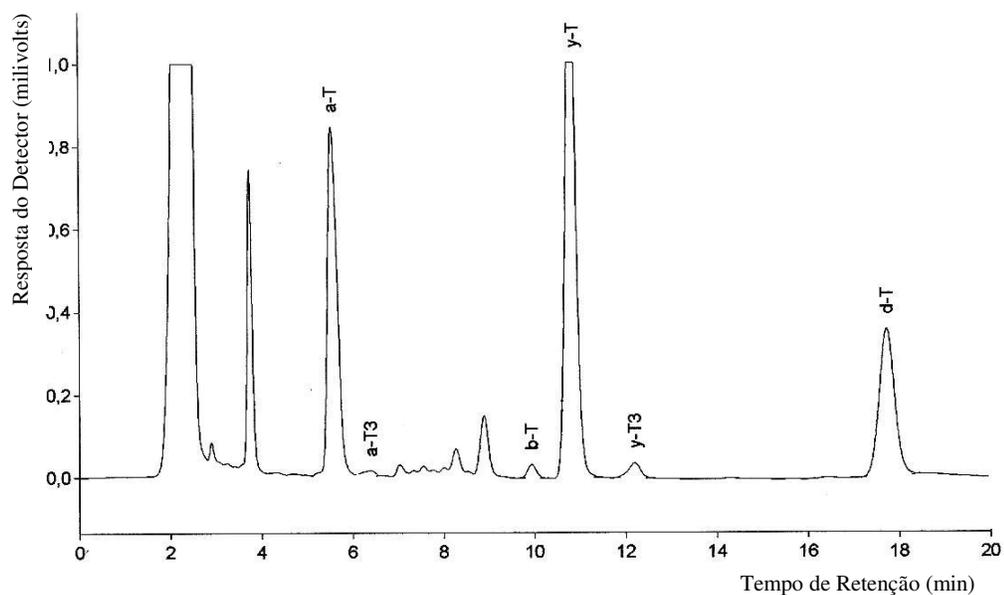


Figura 12. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **cebolinha**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

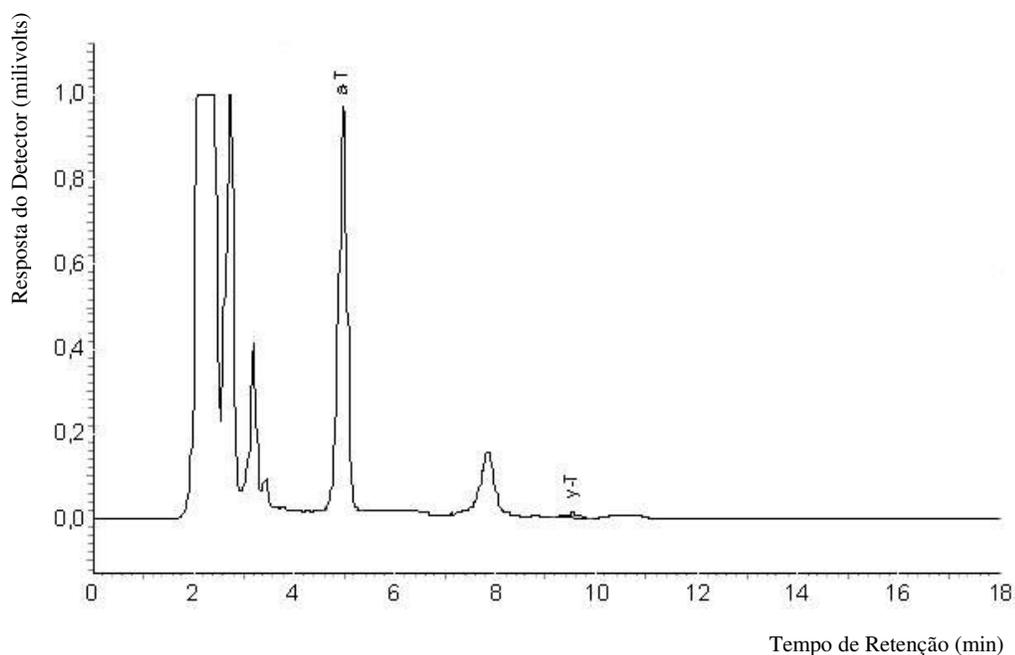


Figura 13. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **espinafre**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

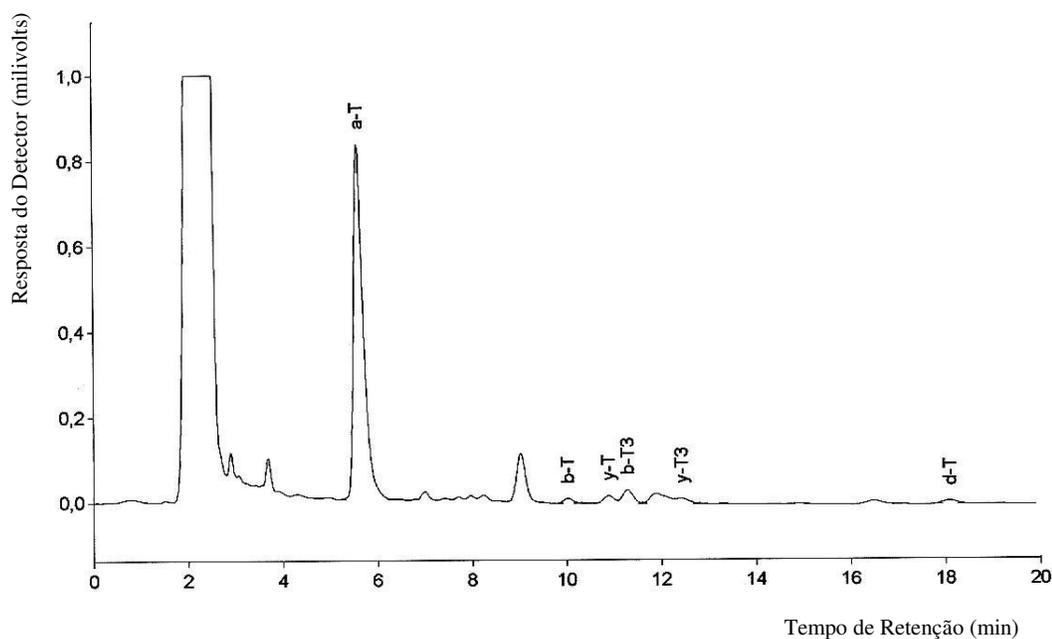


Figura 14. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **pimentão**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

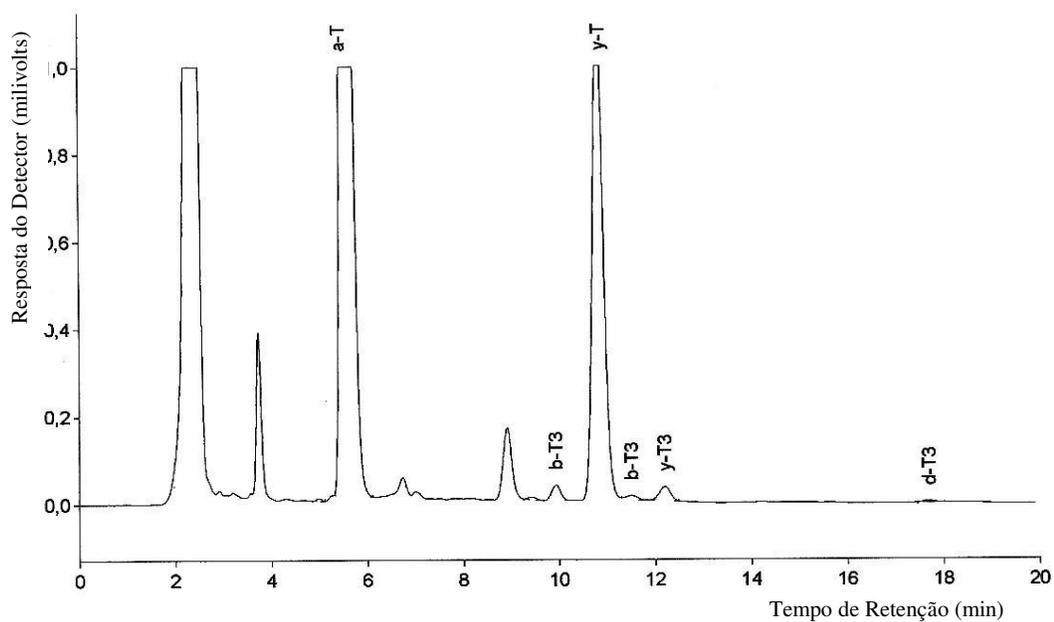


Figura 15. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **rúcula**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

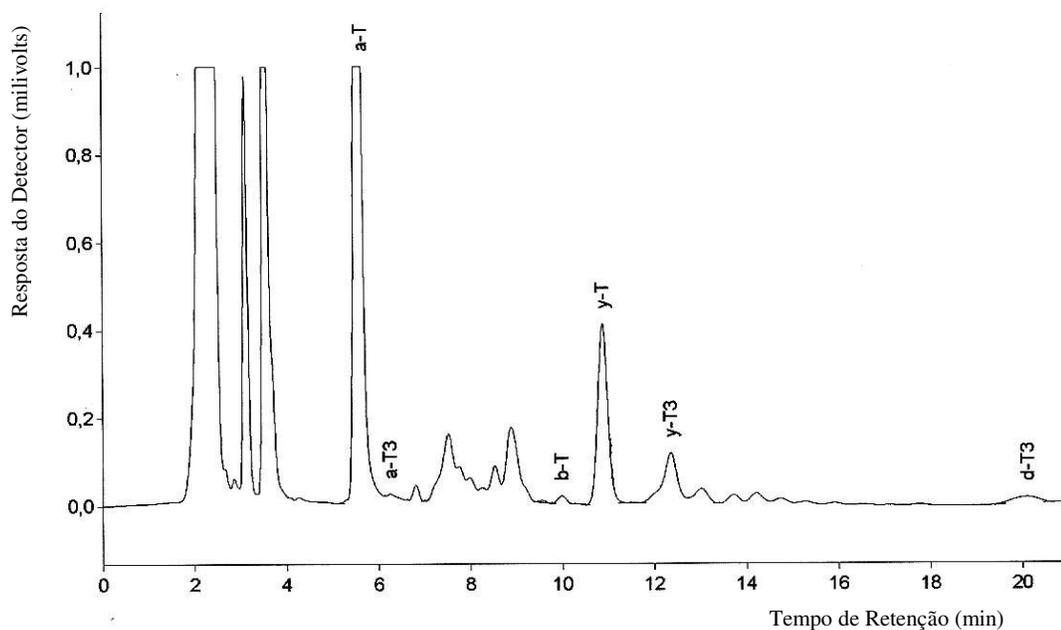


Figura 16. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **salsa**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

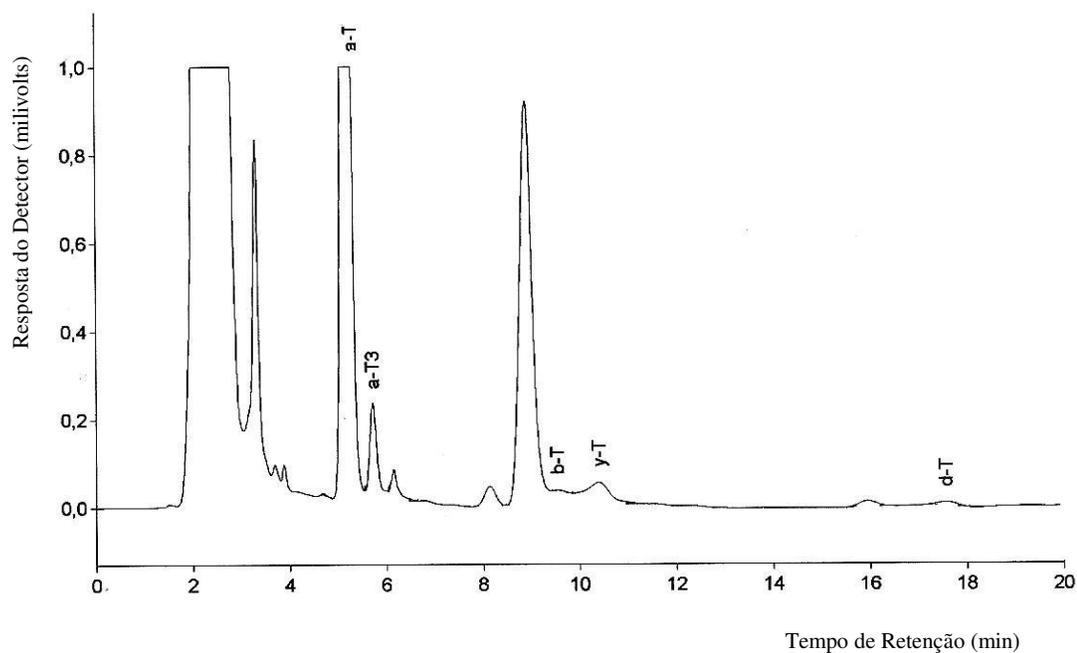


Figura 17. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **gema de ovo crua**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

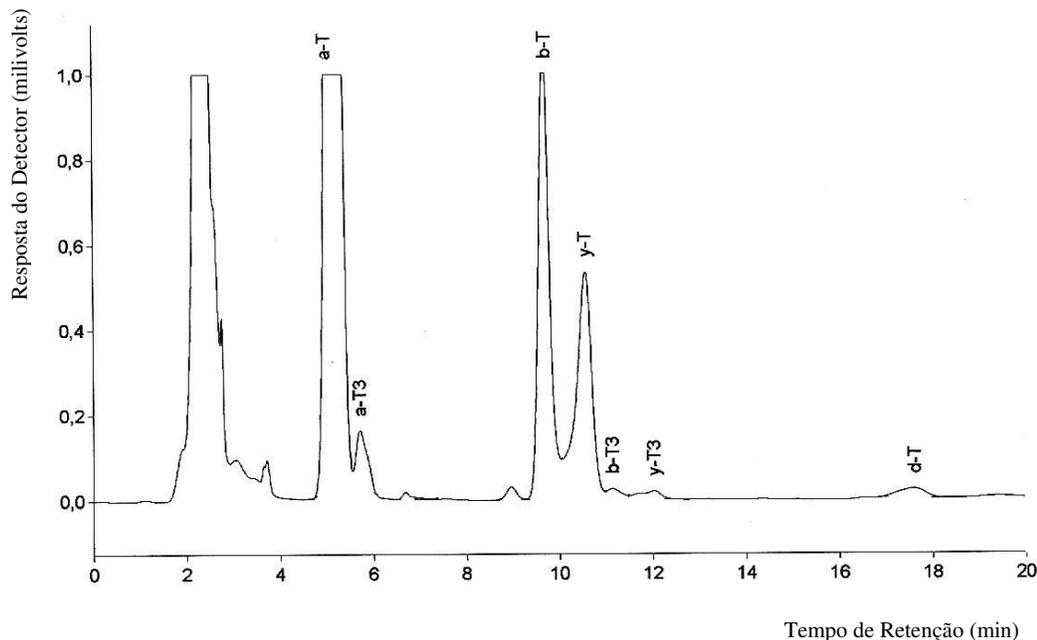


Figura 18. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **gema de ovo cozida**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

Observando-se os cromatogramas das hortaliças e ovos analisados, verifica-se que todos os compostos da vitamina E ocorreram nas amostras, sendo o α - e o γ -tocoferol os isômeros predominantes. Os demais compostos ocorreram em pequenas quantidades, sendo o δ -tocotrienol o isômero mais raro nas amostras analisadas.

Os dados qualitativos são coincidentes com as informações encontradas na literatura (PIIRONEN et al., 1986), que indicam que o α -tocoferol é o composto predominante em hortaliças folhosas verde-escuras e ovos, enquanto que isômeros como β -tocoferol, β -tocotrienol e γ -tocotrienol ocorrem em menor quantidade.

Nas amostras refogadas, observa-se que mesmo em quantidades pequenas de injeção (5 μ L), compostos como α -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol apresentam picos que, em alguns cromatogramas, excedem o registro do detector, indicando que o óleo adicionado aumenta a concentração dos mesmos nos alimentos preparados desta forma.

O cozimento de brócolis e ovos, aparentemente reduziu a ocorrência e área do pico de alguns compostos, podendo indicar uma possível degradação dos isômeros devido a exposição do alimento a altas temperaturas e tempo prolongado de cocção, conforme apresentado na Tabela 4 deste trabalho.

O tempo de análise, embora com pequenas variações, girou em torno de 20 minutos para a eluição dos compostos de interesse. No entanto, considerando que as amostras possuem outros compostos que são detectados por fluorescência nessa faixa de comprimento de onda, o tempo de corrida atingiu cerca de 45 minutos para amostras como couve, brócolis e salsa (Figuras 19 a 21).

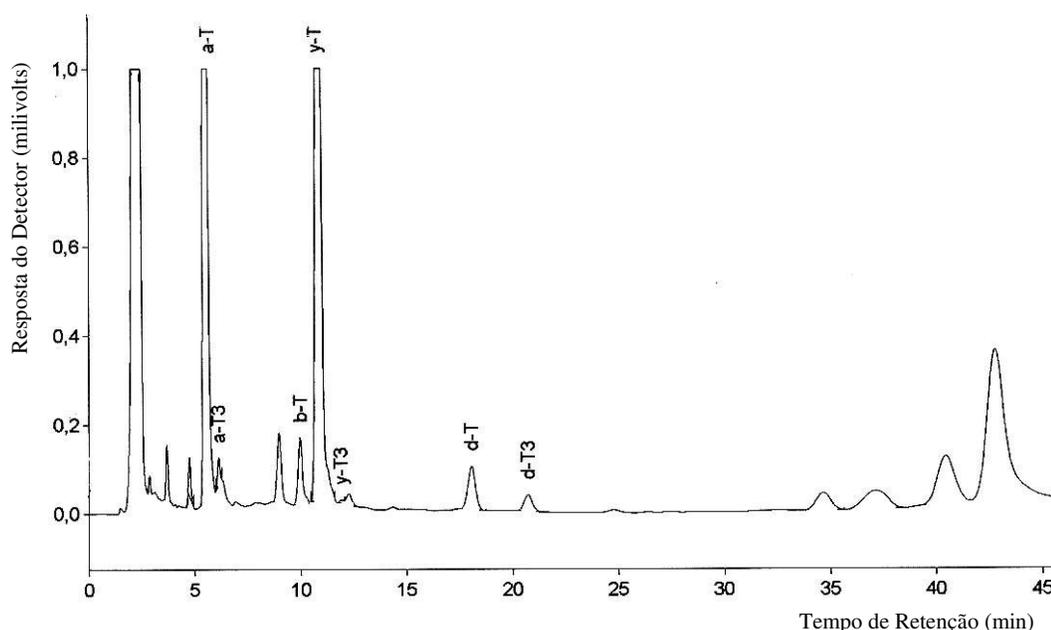


Figura 19. Análise por CLAE de amostra de **couve crua** de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) (Corrida completa). (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: Conforme Figura 4. Injeção: 50 μ L.

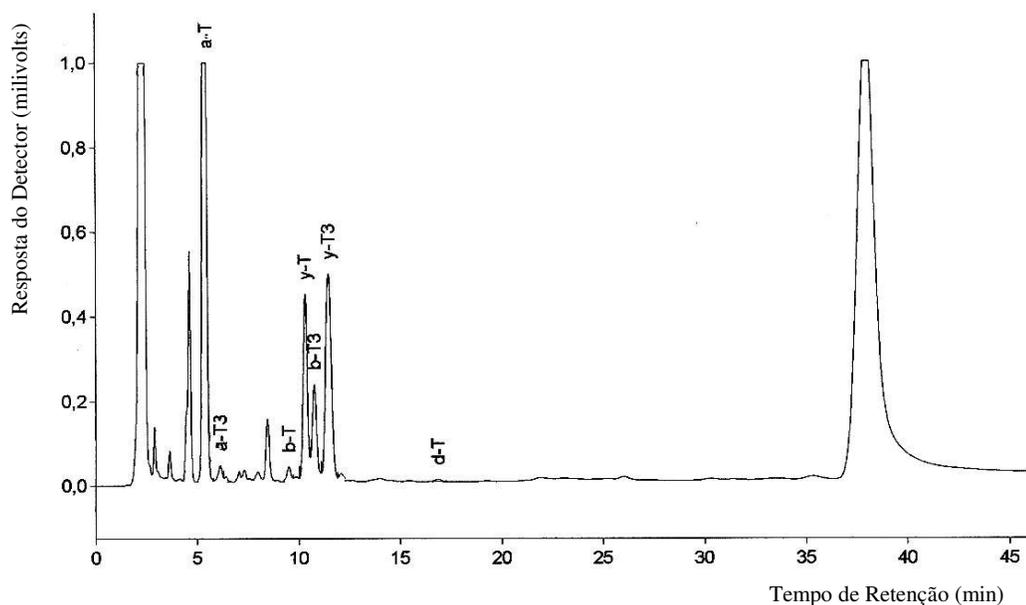


Figura 20. Análise por CLAE de amostra de **brócolis cru** de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) (Corrida completa). (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: Conforme Figura 4; Injeção 50 μ L.

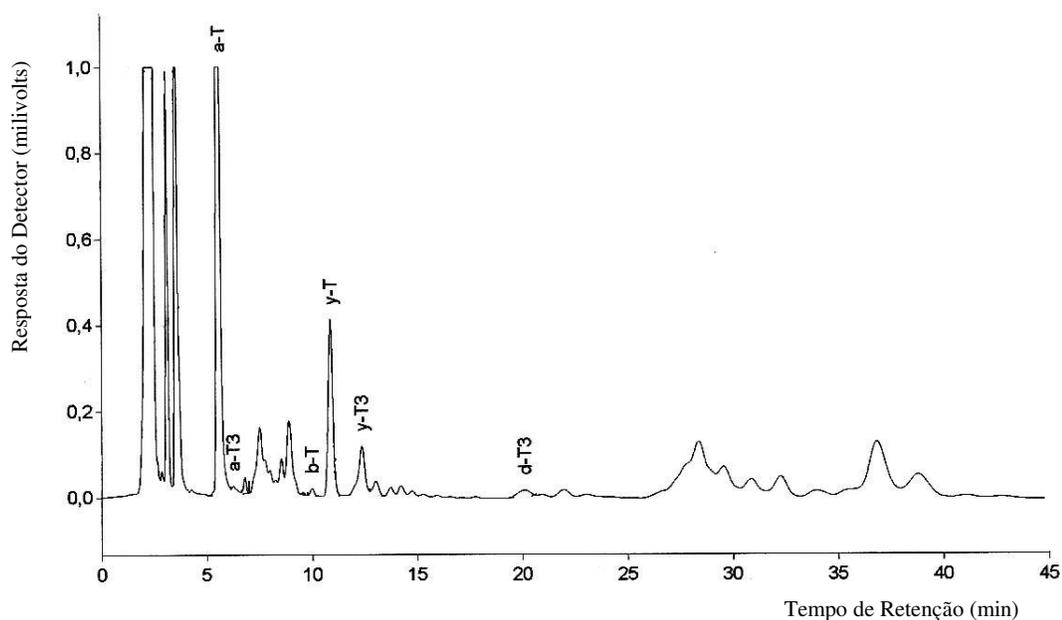


Figura 21. Análise por CLAE da amostra de **salsa** de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) (Corrida completa). (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: Conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

Os cromatogramas obtidos para os óleos (Figuras 22, 23 e 24) mostram que a composição dos isômeros variou bastante de acordo com a espécie vegetal da qual o óleo é originado (CERT et al., 2000). Apesar da identificação ter sido comprovada pela injeção da mistura de padrões no mesmo dia, o tempo de retenção dos óleos se mostrou diferente das outras análises, devido principalmente a variabilidade encontrada do sistema de fase normal, como já discutido anteriormente.

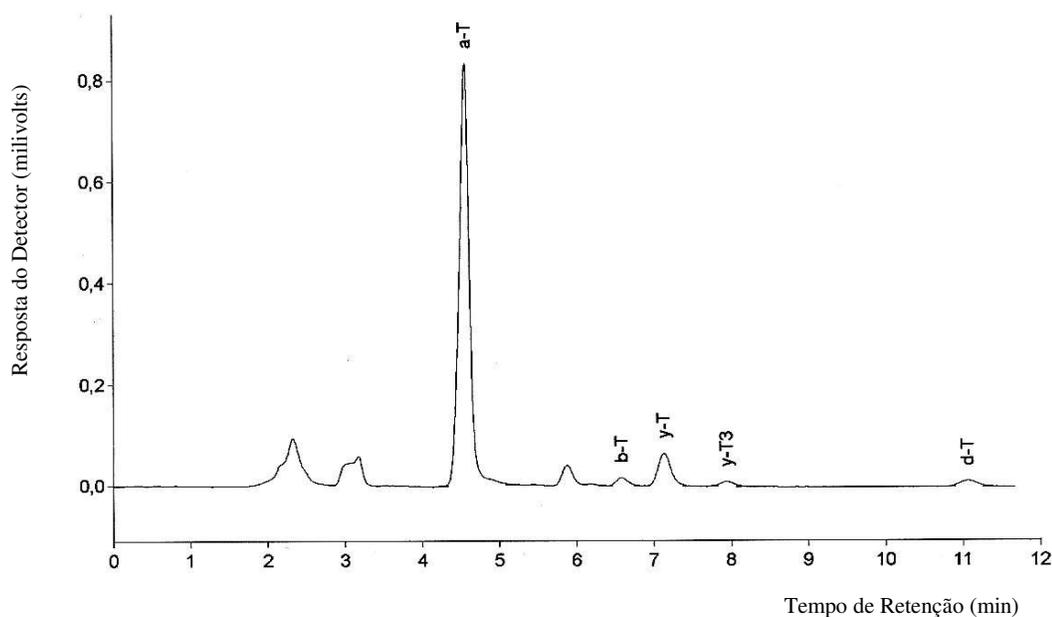


Figura 22. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **óleo de oliva**. (a)= alfa; (b)=beta; (γ)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

O perfil cromatográfico do óleo de oliva mostra que o α -tocoferol é o composto principal, enquanto os demais ocorrem em menores quantidades, sendo que em estudos anteriores nem chegaram a ser detectados (SYVÄÖJA et al., 1986; DIONISI et al., 1995; USDA, 2004).

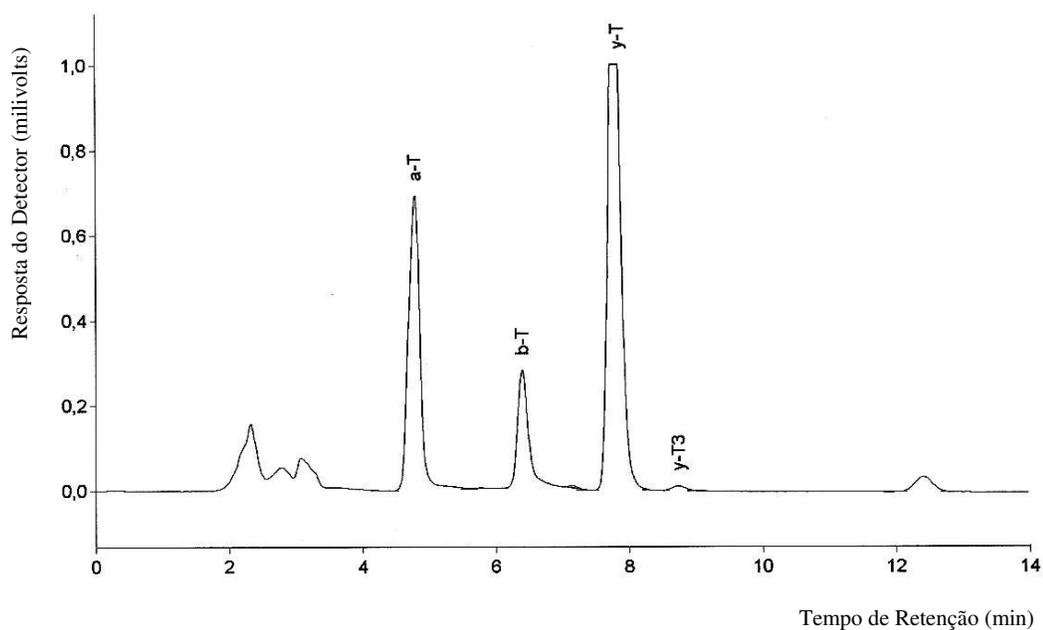


Figura 23. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **óleo de canola**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

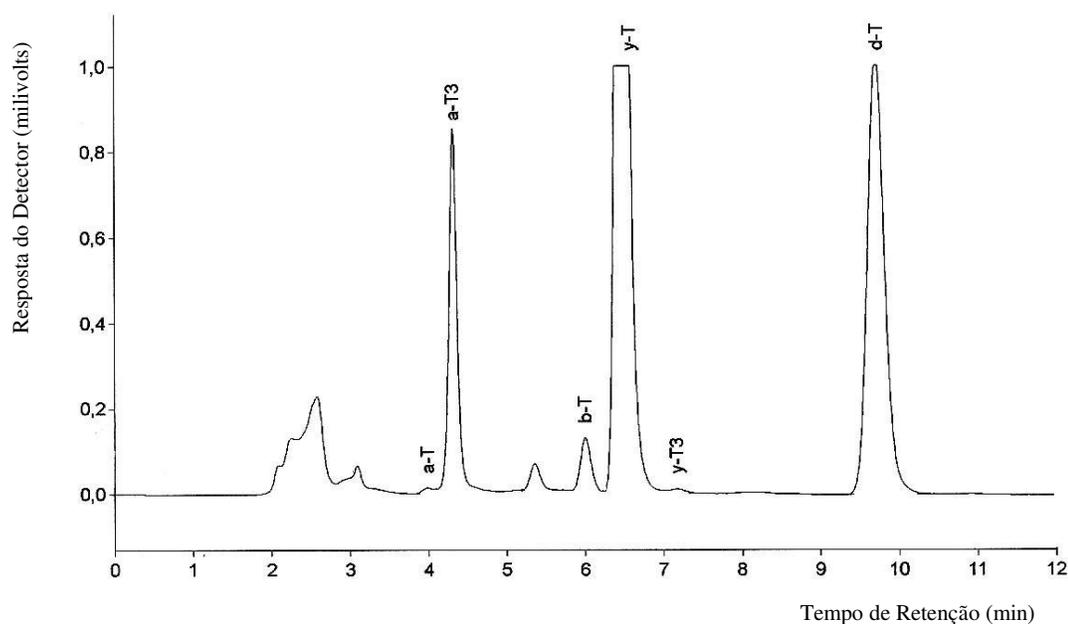


Figura 24. Análise por CLAE de tocoferóis (T) e tocotrienóis (T3) em amostra de **óleo de soja**. (a)= alfa; (b)=beta; (y)= gama; (d)= delta. Condições cromatográficas: conforme Figura 4. Injeção 50 μ L.

Os óleos de canola e de soja apresentaram um perfil cromatográfico semelhante, onde o γ -tocoferol foi o composto predominante. O α -tocoferol e o β -tocoferol ocorrem em menores concentrações. O óleo de soja apresentou o δ -tocoferol, composto que ocorre com menor frequência em outros alimentos.

5.5. Análises Cromatográficas Quantitativas

5.5.1. Curvas-Padrão para Determinação de Tocoferóis e Tocotrienóis

As curvas-padrão obtidas a partir da correlação entre os teores dos compostos e a área dos picos correspondentes, bem como as equações de regressão linear, estão apresentadas nas Figuras 25 e 26.

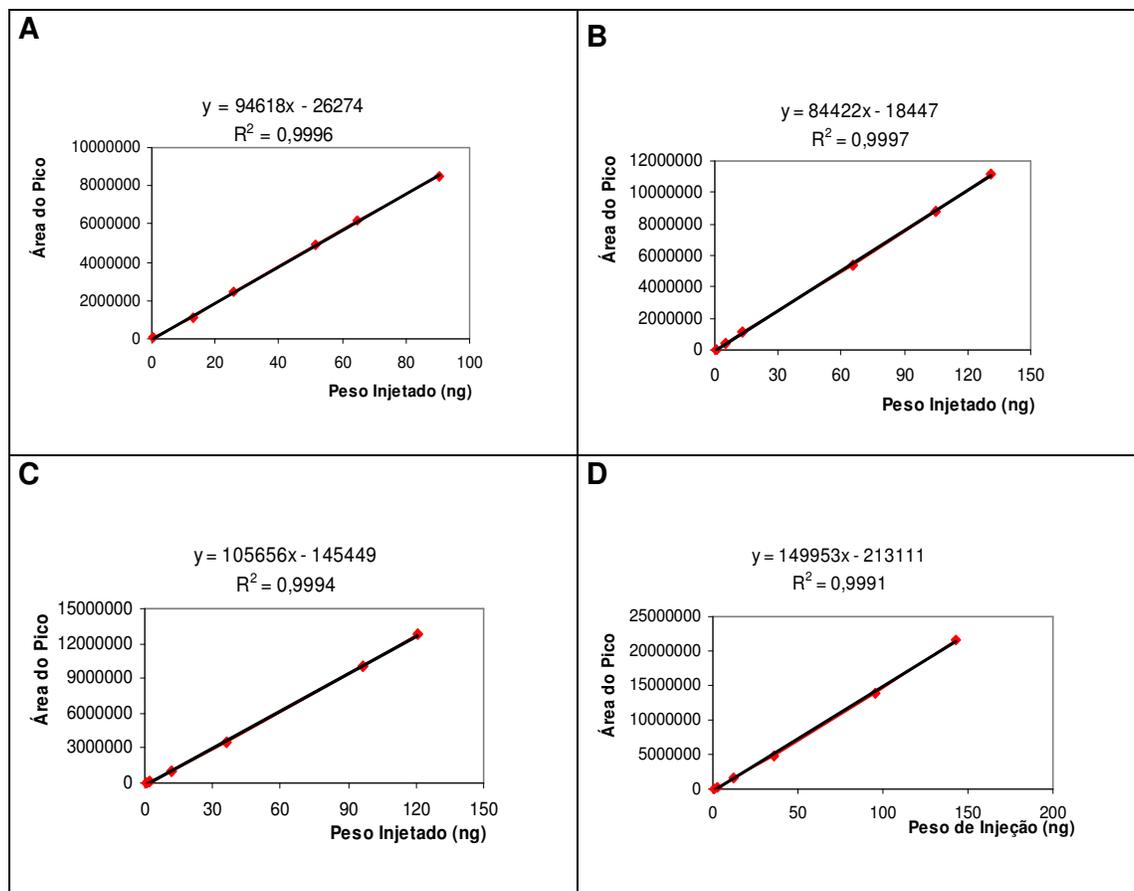


Figura 25. Curvas-padrão para os isômeros tocoferóis (traçada com valores médios de injeções em triplicata). A) α -tocoferol; B) β -tocoferol; C) γ -tocoferol; D) δ -tocoferol

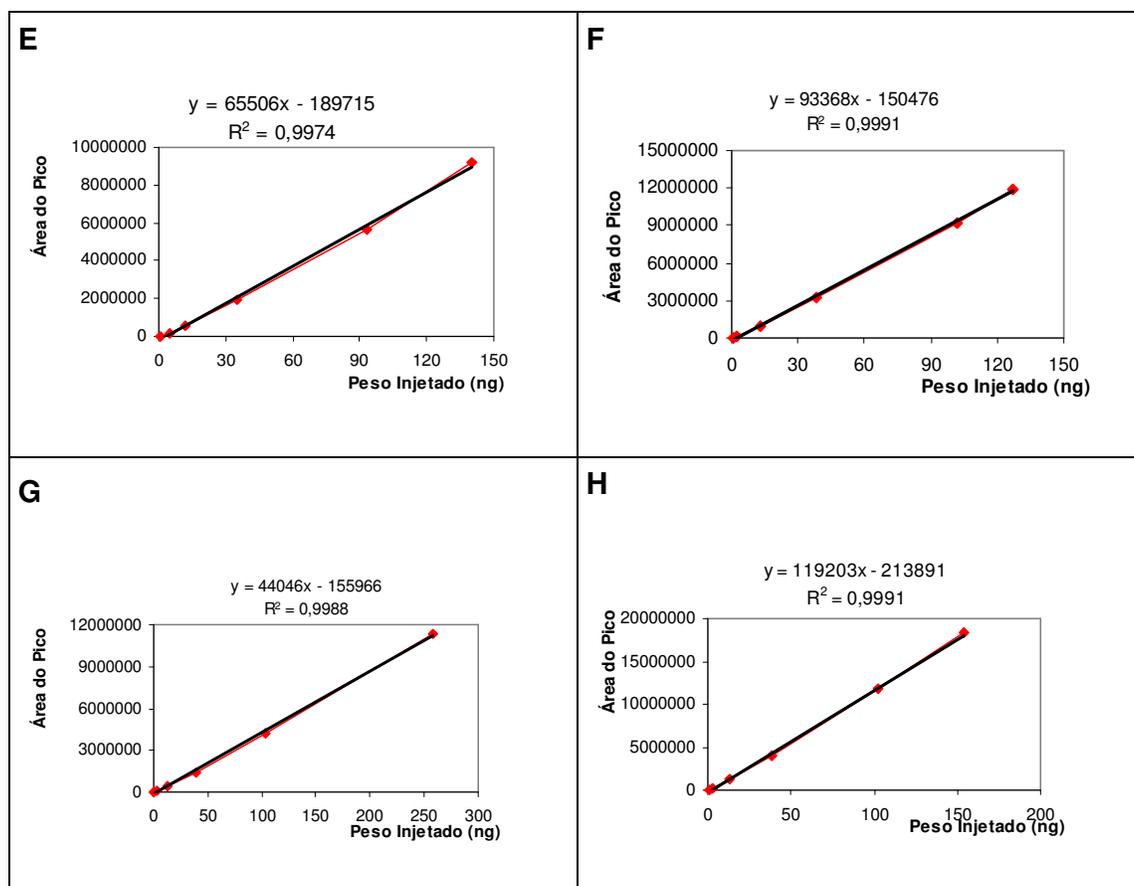


Figura 26. Curvas-padrão para os isômeros tocotrienóis (traçada com valores médios de injeções em triplicata). A) α -tocotrienol; B) β -tocotrienol; C) γ -tocotrienol; D) δ -tocotrienol

5.5.2. Faixa de Linearidade

Os resultados da faixa de linearidade obtidos para tocoferóis e tocotrienóis, utilizando as condições otimizadas neste estudo são apresentados na Tabela 13.

Pode-se observar que a faixa de linearidade para cada composto foi ampla, o que garante a obtenção de dados confiáveis, considerando as faixas analisadas. O coeficiente de correlação (R^2) foi maior que 0,995 em todos os casos.

Tabela 13. Faixa linear obtida para tocoferóis e tocotrienóis determinados por CLAE.

Padrão	Faixa Linear
α-T	2,65 - 92,75 ng
β-T	2,70 - 135,0 ng
γ-T	2,65 - 132,5 ng
δ-T	2,65 - 132,5 ng
α-T3	2,50 - 130,0 ng
β-T3	2,75 - 137,5 ng
γ-T3	2,75 - 137,5 ng
δ-T3	2,70 - 135,0 ng

5.5.3. Recuperação dos Padrões

Os valores obtidos da recuperação dos padrões em amostras de agrião, pimentão verde, rúcula e salsa estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Recuperação de padrões de tocoferóis e tocotrienóis em amostras cruas de agrião, pimentão, rúcula e salsa.

Composto	Recuperação (%)^{1, 2}				Recuperação
	Agrião	Rúcula	Pimentão	Salsa	Média (%) ± DP
α-T	97,6	98,4	99,1	98,2	98,3 ± 0,62
β-T	96,4	94,9	98,6	94,0	96,0 ± 2,01
γ-T	101,4	98,7	100,2	97,8	99,5 ± 1,59
δ-T	100,4	83,7	97,8	97,0	94,7 ± 7,50
α-T3	98,0	99,3	98,3	98,8	98,6 ± 0,57
β-T3	96,7	93,5	94,1	95,2	94,9 ± 1,41
γ-T3	99,1	98,7	99,9	100,01	99,4 ± 0,63
δ-T3	97,2	87,5	92,5	88,0	91,3 ± 4,53

¹ Médias de 3 repetições

² % de Recuperação = (Teor final do composto) - (Quantidade do composto adicionado) / (Teor inicial) x 100

Verifica-se que a recuperação dos padrões nas amostras avaliadas variou entre 83,7 e 101,4%. A taxa de recuperação foi inferior para os isômeros δ -, como já observado em estudo anterior (PIIRONEN et al., 1986). Os demais resultados variaram entre 96,0 e 99,5% em média, e indicam que a metodologia otimizada para análise dos compostos da vitamina E em hortaliças e ovos demonstra ser precisa e, portanto, pode ser empregada com segurança.

Os valores aqui encontrados apresentam-se semelhantes aos encontrados por Lee et al. (1999) ao extrair os compostos diretamente com solventes, onde obtiveram valores médios para recuperação de 84%; 96,4%; 101% e 100,4%, para α -, β -, γ - e δ -tocoferol, respectivamente.

5.5.4. Determinação dos Compostos nas Amostras

Os teores de tocoferóis e tocotrienóis das amostras de hortaliças e ovos analisados crus e após preparação nos dois restaurantes selecionados, estão apresentados nas Tabelas 15 e 16.

O α -tocoferol foi o composto predominante em todos os alimentos avaliados, exceto nas hortaliças preparadas de modo refogado, nas quais o teor de γ -tocoferol foi superior devido, principalmente, ao tipo de óleo utilizado no preparo, como será discutido posteriormente (ver Tabela 19).

Observa-se que a composição em tocoferóis e tocotrienóis variou amplamente de acordo com o tipo de alimento avaliado neste estudo, mas de forma geral, os isômeros tocoferóis foram encontrados em quantidades superiores aos tocotrienóis e em um maior número de amostras. Além do α -tocoferol, as hortaliças analisadas apresentaram quantidades moderadas de γ -tocoferol, pequenas de β - e δ -tocoferóis, e teores baixos de α -, γ - e β -tocotrienóis. O isômero δ -tocotrienol não esteve presente e ou não foi detectado em quantidades consideráveis em nenhuma das amostras avaliadas.

Tabela 15. Teores (Média \pm Desvio Padrão) de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças cruas preparadas em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida).

Alimento	Rest.	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
Agrião	R1	0,4194 ^a \pm 0,104	0,0093 ^a \pm 0,002	0,1281 ^a \pm 0,019	Tr	0,007 ^a \pm 0,003	0,0824 ^a \pm 0,106	0,0368 ^a \pm 0,018	-
	R2	0,7161 ^a \pm 0,341	0,0145 ^a \pm 0,007	0,1581 ^a \pm 0,053	Tr	0,01 ^a \pm 0,004	0,0627 ^a \pm 0,049	0,0341 ^a \pm 0,009	-
Cebolinha	R1	0,2431 ^a \pm 0,030	0,0219 ^a \pm 0,024	0,2807 ^a \pm 0,055	0,0696 ^a \pm 0,048	0,015 ^a \pm 0,011	tr	0,0679 ^a \pm 0,015	tr
	R2	0,4944 ^a \pm 0,375	0,0603 ^a \pm 0,102	0,1391 ^a \pm 0,125	0,1604 ^a \pm 0,218	0,0183 ^a \pm 0,011	tr	0,502 ^a \pm 0,156	tr
Espinafre	R1	0,1806 ^a \pm 0,003	0,0004 ^a \pm 0,012	0,0092 ^a \pm 0,002	0,0055 ^a \pm 0,001	-	-	-	-
	R2	0,1957 ^a \pm 0,027	0,0004 ^a \pm 0,015	0,0116 ^a \pm 0,006	0,0072 ^a \pm 0,001	tr	-	tr	-
Pimentão	R1	0,3404 ^a \pm 0,178	0,0049 ^a \pm 0,002	0,0194 ^a \pm 0,015	0,0088 \pm 0,006	-	0,0131 ^a \pm 0,009	0,02 ^a \pm 0,006	-
	R2	0,1852 ^a \pm 0,044	0,0051 ^a \pm 0,001	0,0181 ^a \pm 0,02	Tr	-	0,0047 ^a \pm 0,006	0,528 ^a \pm 0,502	tr
Rúcula	R1	1,0861 ^a \pm 0,255	0,0244 ^a \pm 0,012	0,3842 ^a \pm 0,140	Tr	tr	0,0064 \pm 0,002	0,02 ^a \pm 0,006	-
	R2	0,6789 ^a \pm 0,120	0,0117 ^a \pm 0,001	0,1895 ^a \pm 0,040	Tr	0,0071 \pm 0,001	-	0,03 ^a \pm 0,002	-
Salsa	R1	0,8586 ^a \pm 0,350	0,0097 ^a \pm 0,004	0,2223 ^a \pm 0,056	0,0044 ^a \pm 0,001	0,0151 ^a \pm 0,006	-	0,191 ^a \pm 0,051	tr
	R2	0,818 ^a \pm 0,379	0,006 ^a \pm 0,003	0,1606 ^a \pm 0,018	0,01 ^a \pm 0,003	0,0277 ^a \pm 0,005	-	0,2647 ^a \pm 0,072	tr

Rest. = Restaurante R1 = Restaurante 1 e R2 = Restaurante 2

Médias (n=3) seguidas da mesma letra na coluna, por alimento – comparação entre restaurantes - não diferem entre si pelo Teste de t Student ($\alpha=5\%$).

(tr): quantidades traços (detectada somente em uma das repetições). (-): não detectado nas amostras analisadas.

Tabela 16. Teores (Média \pm Desvio Padrão) de tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças cruas e cozidas/refogadas e ovos crus e cozidos preparados em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida).

Alimento	Rest.	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
Almeirão Cru	R1	0,3031 ^a \pm 0,061	0,0043 ^a \pm 0,002	0,2131 ^a \pm 0,022	0,015 ^a \pm 0,011	0,0061 \pm 0,001	-	0,0337 \pm 0,018	tr
	R2	0,5243 ^a \pm 0,021	0,0076 ^a \pm 0,004	0,2653 ^a \pm 0,015	0,0058 ^a \pm 0,001	-	-	tr	-
Almeirão Refogado	R1	0,5635 ^b \pm 0,044	0,0356 ^b \pm 0,012	1,7368 ^b \pm 0,222	0,4252 ^b \pm 0,071	0,0081 \pm 0,001	-	0,0484 ^a \pm 0,040	-
	R2	1,9544 ^a \pm 0,215	0,1627 ^a \pm 0,009	6,7884 ^a \pm 0,918	2,0161 ^a \pm 0,123	-	-	0,0804 ^a \pm 0,091	-
Brócolis Cru	R1	0,3568 ^a \pm 0,026	0,0086 ^a \pm 0,003	0,1511 ^a \pm 0,033	0,0052 ^a \pm 0,001	0,0149 ^a \pm 0,006	0,1124 \pm 0,060	0,0169 ^a \pm 0,006	-
	R2	0,4744 ^a \pm 0,090	0,0107 ^a \pm 0,002	0,3062 ^a \pm 0,169	0,0065 ^a \pm 0,001	0,0123 ^a \pm 0,003	tr	tr	-
Brócolis Cozido	R1	0,2953 ^b \pm 0,137	0,0058 ^a \pm 0,003	0,0791 ^a \pm 0,043	0,004 ^a \pm 0,001	0,0074 ^a \pm 0,002	0,026 \pm 0,009	0,0144 ^a \pm 0,007	-
	R2	0,5821 ^a \pm 0,113	0,0032 ^a \pm 0,001	0,1164 ^a \pm 0,012	0,0047 ^a \pm 0,001	0,0147 ^a \pm 0,005	tr	tr	-
Couve Crua	R1	0,9691 ^a \pm 0,321	0,0291 ^a \pm 0,031	0,3971 ^a \pm 0,221	0,1974 ^a \pm 0,020	0,0579 \pm 0,034	0,0704 \pm 0,102	0,0405 ^a \pm 0,017	tr
	R2	1,3234 ^a \pm 0,244	0,0569 ^a \pm 0,032	0,2465 ^a \pm 0,101	0,0273 ^a \pm 0,007	tr	-	0,082 ^a \pm 0,058	tr
Couve Refogada	R1	1,399 ^b \pm 0,419	0,0978 ^b \pm 0,041	2,8729 ^a \pm 1,138	0,6927 ^b \pm 0,465	0,0326 ^a \pm 0,035	tr	tr	tr
	R2	2,3561 ^a \pm 0,229	0,209 ^a \pm 0,341	4,2945 ^a \pm 3,754	1,837 ^a \pm 0,346	0,0747 ^a \pm 0,078	-	0,2837 \pm 0,228	-
Ovo (gema) cru	R1	0,8263 ^a \pm 0,095	0,0086 \pm 0,002	tr	tr	0,0858 ^a \pm 0,008	tr	-	-
	R2	1,1271 ^a \pm 0,179	-	-	0,0043 \pm 0,0003	0,0888 ^a \pm 0,002	-	0,0169 \pm 0,012	-
Ovo (gema) Cozido	R1	0,7166 ^b \pm 0,05	tr	0,2043 ^b \pm 0,045	tr	0,0735 ^a \pm 0,013	0,1717 \pm 0,222	tr	-
	R2	1,0141 ^a \pm 0,062	-	0,5475 ^a \pm 0,044	tr	0,0818 ^a \pm 0,007	-	0,0147 \pm 0,008	-

Médias (n=3) seguidas da mesma letra na coluna, por preparação, não diferem entre si pelo Teste de *t* Student (α = 5%). R1 e R2 = Restaurante 1 e 2.

Poucos estudos são encontrados na literatura avaliando a composição isomérica completa da vitamina E em hortaliças. Além disso, os trabalhos encontrados geralmente trazem dados do conteúdo vitamínico de hortaliças comumente produzidas e consumidas nos países de origem, o que faz com que muitos dos alimentos analisados nestes estudos não tenham dados anteriores para comparação, como já destacado por Ching e Mohamed (2001). O mesmo ocorreu neste estudo, uma vez que, analisando a literatura publicada a nível mundial, nenhuma informação foi encontrada acerca dos compostos da vitamina E em alguns alimentos como agrião, almeirão, couve e rúcula. Com relação aos teores de vitamina E em alimentos brasileiros, nenhum estudo foi encontrado na literatura.

Considerando as hortaliças aqui avaliadas como pertencentes ao grupo de folhosos verde-escuros, de forma geral os resultados obtidos se assemelham aos dados encontrados na literatura (SHEPPARD et al., 1992), principalmente para os isômeros tocoferóis, uma vez que a presença e concentração de tocotrienóis se apresentam bastante variáveis entre os trabalhos já realizados (PIIRONEN et al., 1986; AZZI e STOCKER, 2000).

Essas variações podem ser consequência da ação de inúmeros fatores, muitos dos quais inviáveis de se controlar em um estudo como este, que objetivou avaliar as condições reais de obtenção no mercado comum de alimentos, as formas de armazenamento, preparação e distribuição aos clientes em restaurantes comerciais. Deste modo, as diversas variedades existentes para algumas hortaliças, a própria distribuição desigual da vitamina no alimento, as condições de cultivo, a intensidade da luz solar recebida, o tempo de cultivo, a época de colheita e as formas de armazenamento e manipulação, desde o momento de saída do campo até a etapa de preparação pelos restaurantes, podem explicar as diferenças do conteúdo ou mesmo a ocorrência ou não dos compostos nas amostras analisadas (PIIRONEN et al., 1986; EITENMILLER, 1997).

Além das fontes de variação citadas, os diferentes métodos analíticos utilizados para determinação dos compostos, bem como as condições e procedimentos empregados para a manipulação e preparo das amostras para análise, podem apresentar interferência direta no conteúdo final de

vitamina E detectado nos alimentos. Vale também salientar que os tocoferóis e tocotrienóis são sensíveis à luz e ao ar, sendo que a degradação parcial ou total de um ou mais compostos pode implicar em erros importantes de quantificação (DIONISI et al., 1995; LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2001).

Com base nos resultados obtidos observou-se que os teores dos compostos para alguns alimentos apresentaram uma variação considerável entre as repetições e entre os dois restaurantes. No entanto, exceto para os alimentos que foram cozidos ou refogados, essas diferenças não apresentaram significância estatística para nenhum dos isômeros determinados.

Os resultados indicam que as hortaliças e ovos utilizados nos dois restaurantes sofreram ação de fatores relacionados ao cultivo (hortaliças provenientes de locais de cultivo diferentes), colheita e transporte que, embora induzam certa variabilidade entre as repetições, parecem não exercer papel determinante no conteúdo vitamínico entre as amostras dos dois restaurantes. Isso pode ser também confirmado pelo fato de que as hortaliças (os folhosos, principalmente) que chegam do campo e foram preparadas e servidas em poucas horas não diferiram significativamente em seus teores de vitamina E.

Uma vez que as amostras foram coletadas já prontas para serem consumidas ou antes de serem utilizadas em outras preparações (para o caso de cebolinha, salsa e pimentão), não foi possível conhecer o conteúdo inicial da amostra (no momento da recepção no estabelecimento), o que impossibilitou a avaliação criteriosa do efeito das condições de manuseio dentro dos restaurantes sobre os compostos da vitamina E.

No entanto, considerando que exista uma certa homogeneidade dos teores da vitamina E quando os alimentos chegam do campo, pode-se inferir que os procedimentos utilizados para armazenamento, pré-preparo e preparo das amostras nos estabelecimentos não exerceram efeito significativo sobre o conteúdo vitamínico, a ponto de induzir variações superiores às consideradas esperadas devido aos fatores intrínsecos (variedade, cultivo e outros) já mencionados.

As temperaturas e tempos de espera diferenciados, utilizados nos dois restaurantes para o pré-preparo, preparo e a exposição do alimento parecem não ter sido determinantes ($\alpha=5\%$) sobre o conteúdo vitamínico das amostras analisadas. Isso pode ser bem exemplificado para o pimentão, que é fatiado e armazenado até o momento do uso por 16 horas no Restaurante 1 e por 4 horas, no Restaurante 2, sob temperaturas de 10° e 8°C, respectivamente. Essa grande diferença no tempo de exposição da matriz do alimento ao ar e a luz parece não ter efeito prejudicial sobre o nível dos compostos da vitamina E, considerando teores iniciais homogêneos.

Já para os alimentos que foram cozidos e refogados, os teores vitamínicos obtidos foram significativamente diferentes entre os restaurantes, o que indica que os métodos de preparação empregados em cada local têm interferência sobre o conteúdo final das amostras.

Observando-se os resultados dos alimentos que foram refogados (almeirão e couve), houve um aumento no teor dos compostos em relação às suas amostras cruas devido a adição de óleo. Considerando que o óleo de soja foi utilizado para refogar essas hortaliças em ambos os restaurantes, verifica-se que os isômeros que apresentaram uma elevação mais significativa seguem o perfil dos compostos predominantes do óleo de soja, como o α -, o γ - e o δ -tocoferol (SYVÄÖJA et al., 1986; EITENMILLER, 1997).

Os valores encontrados para α -tocoferol em brócolis (0,3568 a 0,4744 mg/100g) se assemelham aos dados de Azzi e Stocker (2000) e Piironen et al. (1986), que encontraram teores de 0,50 e 0,68 mg/100g, respectivamente. Lee et al. (2000) encontraram valores deste composto em brócolis variando de 0,62 a 1,08 mg/100g, ao utilizar diferentes metodologias de extração. No entanto, os valores superiores de γ -tocoferol, além da detecção de isômeros como β - e δ -tocoferol e α -tocotrienol, fazem com que o brócolis analisado neste estudo tenha uma composição isomérica diferente das análises realizadas em trabalhos anteriores. Observa-se também que a metodologia utilizada neste estudo foi eficiente em extrair os isômeros de menor concentração.

Estudos realizados com ovos indicam que os compostos da vitamina E são encontrados somente na gema, enquanto que a clara praticamente não contém essa vitamina. No entanto, a maior parte dos trabalhos que avaliaram o conteúdo de tocoferóis em ovos, utilizaram o alimento enriquecido, uma vez que a adição de vitamina E à ração de aves é uma prática comum em vários países (SYVÄOJA et al., 1985; KANG et al., 1998).

Esse mesmo fato foi mencionado por SYVÄOJA et al. (1985), ao encontrarem teores de 5,50 mg/100g de α -tocoferol na gema crua, valor muito superior ao relatado por outros estudos. Teores de α -tocoferol variando de 0,5 a 2,75 mg/100g (BAUERFEIND, 1977 e McLaughlin e Weihrauch, 1979, citados por SYVÄOJA et al., 1985; AZZI e STOCKER, 2000) podem ser considerados próximos ao encontrado neste estudo, onde as concentrações variaram entre 0,8263 a 1,1271 mg/100g na gema crua. Os isômeros β - e γ -tocoferóis e α -tocotrienol também foram detectados no trabalho de Syvaaja et al. (1985), sendo que em nenhum outro estudo esses isômeros foram encontrados.

Quando agrupados por características semelhantes ou de uso, a análise de variância da interação alimento e restaurante não foi significativa, o que permitiu a comparação dos teores médios das hortaliças, calculados a partir das seis repetições, desconsiderando os diferentes restaurantes nas quais as mesmas foram coletadas. Dessa forma, os teores médios dos compostos da vitamina E para as hortaliças cruas analisadas estão apresentados nas Tabelas 17 e 18. Para isso, dois grupos foram separados para comparação: folhosos (agrião, almeirão, couve, espinafre e rúcula) e temperos (cebolinha, pimentão e salsa).

De acordo com os resultados obtidos para o grupo de folhosos, observa-se que os conteúdos de α -, β -, γ -tocoferol e α -tocotrienol são diferentes entre as hortaliças analisadas, sendo que os outros isômeros não diferiram estatisticamente entre os cinco alimentos. Dessa forma, considerando o teor de α -tocoferol, a couve é a hortaliça que apresentou o maior conteúdo (1,1463 mg/100g) seguida pela rúcula (0,8825 mg/100g), agrião e almeirão (0,5678 e 0,5251 mg/100g, respectivamente) e espinafre (0,1882 mg/100g).

Nenhuma informação foi encontrada na literatura acerca do conteúdo de vitamina E de agrião, almeirão e rúcula, hortaliças que, neste estudo, apresentaram conteúdo considerável de α -tocoferol. Uma vez que são folhosos consumidos com frequência em certas regiões do Brasil, esses resultados representam uma contribuição importante para o conhecimento do valor nutritivo desses alimentos.

Somente um dado foi encontrado informando o teor de α - e γ -tocoferol da couve (1,92 e 0,23 mg/100g, respectivamente), em trabalho realizado por Kurilich et al. (1999) citado por Bianchini-Pontuschka (2003). As amostras avaliadas neste estudo apresentaram concentrações semelhantes, apontando a couve como uma boa fonte de α -tocoferol.

Já para espinafre, alguns estudos apontam este vegetal como uma boa fonte de vitamina E, com valores de α -tocoferol variando entre 1,22 a 1,8 mg/100 g (PIIRONEN et al., 1986; AZZI e STOCKER, 2000), sendo que nestes trabalhos nenhum outro isômero foi detectado. Contrariando esses dados, o teor médio obtido neste estudo (0,1882 mg/100g de α -tocoferol) para as amostras de espinafre analisadas foi inferior ao mencionado pela literatura. As variações já citadas, como as variedades usadas no Brasil e condições de solo, podem ser os principais responsáveis por esses resultados.

Dessa forma, de acordo com as amostras avaliadas, o espinafre cultivado nesta região apresenta teor bem inferior aos encontrados em estudos anteriores, para hortaliças cultivados na Finlândia e EUA.

Tabela 17. Teores de tocoferóis e tocotrienóis (Média \pm Desvio Padrão) para hortaliças folhosas preparadas em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida).

Alimento	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
Agrião	0,5678 ^c \pm 0,278	0,0119 ^b \pm 0,005	0,1431 ^b \pm 0,039	0,0163 ^a \pm 0,003	0,0088 ^b \pm 0,003	0,0706 ^a \pm 0,064	0,0355 ^a \pm 0,013	-
Almeirão	0,5251 ^c \pm 0,447	0,0051 ^b \pm 0,003	0,2261 ^{ab} \pm ,032	0,0127 ^a \pm 0,010	0,0061 ^b \pm ,0002	-	0,0312 ^a \pm 0,016	-
Couve	1,1463 ^a \pm 0,323	0,0430 ^a \pm 0,032	0,3218 ^a \pm 0,174	0,0143 ^a \pm 0,012	0,0472 ^a \pm 0,035	0,0704 ^a \pm 0,102	0,0613 ^a \pm 0,045	-
Espinafre	0,1882 ^d \pm 0,019	0,0004 ^b \pm ,0001	0,0104 ^c \pm 0,004	0,0064 ^a \pm 0,001	0,0055 ^b \pm -	-	0,0203 ^a \pm -	-
Rúcula	0,8825 ^b \pm 0,285	0,0180 ^b \pm 0,010	0,2869 ^a \pm 0,141	0,0077 ^a \pm 0,006	0,0111 ^b \pm 0,003	0,0064 ^a \pm ,0014	0,2739 ^a \pm 0,422	-

Médias ($n=6$, exceto para almeirão $n=4$) seguidas de pelo menos uma letra na coluna não diferem entre si ($\alpha=5\%$), pelo teste de Duncan.

Tabela 18. Teores de tocoferóis e tocotrienóis (Média \pm Desvio Padrão) para hortaliças utilizadas como temperos em restaurantes comerciais, em mg/100g (base úmida).

Alimento	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
Cebolinha	0,3688 ^b \pm 0,275	0,0411 ^a \pm 0,069	0,2099 ^a \pm 0,116	0,1059 ^a \pm 0,125	0,0167 ^a \pm 0,010	0,0231 ^a \pm 0,019	0,0730 ^a \pm 0,109	-
Pimentão	0,2628 ^b \pm 0,144	0,0050 ^a \pm ,0009	0,0188 ^b \pm 0,016	0,0079 ^a \pm ,0045	-	0,0089 ^a \pm ,0076	0,2739 ^a \pm 0,422	-
Salsa	0,8383 ^a \pm 0,327	0,0078 ^a \pm ,0035	0,1915 ^b \pm 0,050	0,0078 ^a \pm 0,004	0,0214 ^a \pm 0,008	-	0,0755 ^a \pm 0,057	-

Médias ($n=6$) seguidas de pelo menos uma letra na coluna não diferem entre si ($\alpha=5\%$), pelo teste de Duncan.

Seguindo a tendência dos folhosos, o grupo dos temperos também apresentou o α - e o γ -tocoferol como os isômeros principais, com teores diferindo significativamente entre as três hortaliças. Os demais isômeros ocorreram em quantidades pequenas, mas de relevância para o sistema antioxidante do próprio vegetal.

O conteúdo em α -tocoferol da salsa (0,8383 mg/100g) foi significativamente maior que o de cebolinha e pimentão (0,3688 e 0,2628 mg/100g, respectivamente). Os valores obtidos para essas amostras são mais baixos que os encontrados na literatura para as mesmas hortaliças (SHEPPARD et al., 1992). Piironen et al. (1986), avaliando os teores de tocoferóis e tocotrienóis em diversas hortaliças e frutas consumidas na Finlândia, não detectaram tocotrienóis e δ -tocoferol em nenhuma das amostras, mas encontraram 3,58; 2,16 e 1,58 mg/100g de α -tocoferol para salsa, pimentão e cebolinha, valores esses bem mais altos do que os observados neste estudo. Novamente, fatores relacionados ao solo, variedade da planta e outras condições de cultivo podem ter interferência nestes resultados.

Com relação ao conteúdo de vitamina E das hortaliças que foram comparadas com dados apontados em trabalhos realizados anteriormente, pode-se afirmar que, para as amostras analisadas, as hortaliças dessa região do Brasil (zona da Mata de Minas Gerais) são mais pobres em α -tocoferol do que avaliadas na Europa e EUA.

Os maiores valores de α -tocoferol entre as hortaliças analisadas foram encontrados em hortaliças folhosas verde-escuros (couve, rúcula, salsa, agrião), como indicado pela literatura. No entanto, somente a couve apresentou conteúdo superior à 1mg/100g (base úmida), podendo ser considerada uma fonte rica em vitamina E.

Em resumo, observou-se a escassez de dados para comparação dos isômeros da vitamina E em hortaliças e ovos. Os poucos trabalhos encontrados, em geral, não detectaram os isômeros presentes em menor concentração nesses alimentos. Tais achados podem ser devidos à ausência verdadeira desses compostos nas amostras analisadas, à utilização de métodos de extração danosos à vitamina, ou ainda à utilização

de métodos de análise que não detectaram os compostos. Portanto, a detecção de compostos como β - e δ -tocoferóis e alguns tocotrienóis neste estudo indica que as hortaliças e ovos analisados os contêm em sua matriz, mesmo em menor quantidade, além de indicar que a metodologia utilizada foi eficiente em extrair e detectar os isômeros de menor concentração.

Por terem sido utilizados em algumas preparações analisadas neste trabalho, a avaliação dos teores de vitamina E em óleos comumente utilizados em restaurantes comerciais mostrou-se pertinente. Os resultados obtidos para óleos de soja, de canola e óleo de oliva extra-virgem são apresentados na Tabela 19.

Observa-se que, de modo geral, os óleos avaliados contêm elevadas quantidades de isômeros tocoferóis, sendo que pequenas concentrações de γ -tocotrienol foram detectadas. Diversos estudos mostram que os tocotrienóis não são compostos de ocorrência comum em óleos de soja e canola, e são apontados como os melhores marcadores para avaliação da pureza de óleo de oliva (SYVÄOJA et al., 1986; EITENMILLER, 1997). A presença de pequenas quantidades de tocotrienóis no óleo de oliva, como encontrado neste estudo, pode indicar adição de outros tipos de óleo que contêm tocotrienóis (DIONISI et al., 1995).

Com relação aos teores de α -tocoferol, o óleo de canola apresenta um conteúdo significativamente maior que os óleos de soja e oliva para as amostras analisadas. No entanto, considerando a utilização desses óleos, pode-se apontar o óleo de soja como uma das principais fontes de vitamina E para as populações ocidentais, uma vez que é o óleo comestível mais difundido e utilizado como matéria-prima de outros produtos alimentícios, como margarina e maionese (EITENMILLER, 1997).

Exceto para o de oliva, o γ -tocoferol foi o composto encontrado em maior concentração nos óleos analisados, especialmente no de soja, bem como na maioria dos óleos vegetais (EITENMILLER, 1997; JIANG et al., 2001). A riqueza em γ -tocoferol e a grande utilização do óleo de soja o tornava a principal fonte de equivalentes de α -tocoferol, antes da revisão das recomendações pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos. Após a indicação de uso das IDR's, a grande concentração do composto é

Tabela 19. Teores de tocoferóis e tocotrienóis (Média \pm Desvio Padrão) em óleos vegetais, em mg/100g.

Óleo	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
Oliva	14,0436 ^b \pm 1,681	0,4741 ^c \pm 0,087	1,5150 ^c \pm 0,157	0,3691 ^b \pm 0,190	-	-	1,2283 ^a \pm 0,088	-
Canola	18,3931 ^a \pm 0,964	5,1578 ^a \pm 1,429	39,0238 ^b \pm 8,929	1,1900 ^b \pm 0,031	-	-	1,1416 ^a \pm 0,218	-
Soja	12,1401 ^b \pm 1,624	2,8146 ^b \pm 0,441	64,2734 ^a \pm 3,982	22,572 ^a \pm 1,220	-	-	0,8104 ^a \pm 0,141	-

Médias seguidas ($n=3$) de pelo menos uma letra na coluna não diferem entre si ($\alpha=5\%$), pelo teste de Duncan.

totalmente desprezada para aproveitamento nutricional em humanos, mas seu papel como um dos principais colaboradores no sistema antioxidante de vegetais não pode ser esquecido (JIANG et al., 2001).

Além de concentrações moderadas de β -tocoferol, é interessante destacar que os óleos vegetais apresentam quantidades apreciáveis de δ -tocoferol, um dos mais potentes antioxidantes em alimentos, o que indica a forte correlação antioxidante existente entre a vitamina E e a presença de ácidos graxos insaturados (AZZI e STOCKER, 2000). Neste estudo, o óleo de soja apresentou um conteúdo em δ -tocoferol significativamente maior que os demais óleos analisados.

Estudos realizados na Finlândia, Estados Unidos e Espanha informam teores em óleo de soja que variam entre 1,2 a 11,91; 1,4 a 69,86 e 16,6 a 23,87 mg/100g para α -, γ - e δ -tocoferol, respectivamente (SYVÄÖJA et al., 1986; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003; USDA, 2004). Comparando os valores encontrados para estes compostos nas amostras de óleo de soja avaliadas neste estudo (12,14; 64,27 e 22,57 mg/100g, para α -, γ - e δ -tocoferol, respectivamente), observa-se que os resultados são semelhantes aos dados mencionados acima, e indica que o óleo de soja brasileiro é uma fonte importante de vitamina E.

Os resultados obtidos para óleo de oliva (14,04 mg/100g de α -tocoferol) também são condizentes com os valores encontrados na literatura (10,70 a 19,2 mg/100g), embora a maior parte dos estudos não têm detectado outros isômeros além do α -tocoferol em suas análises (SYVÄÖJA et al., 1986; DIONISI et al., 1995; USDA, 2004).

Os valores encontrados para α - e γ -tocoferol para o óleo de canola (18,39 e 39,02 mg/100g, respectivamente) se mostram condizentes com teores indicados na literatura (13,2 a 41; e 4,2 a 21,8 mg/100 g, para α - e γ -tocoferol), apesar da grande variação no teor dos compostos que parece existir nesse tipo de óleo (SHEPPARD et al., 1992; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003).

É importante ressaltar que as análises foram conduzidas com óleos refinados, a fim de estimar o consumo real pela população. No entanto, a literatura é unânime em afirmar que grandes perdas de vitamina E ocorrem

durante a etapa de extração e refinamento do óleo, onde altas temperaturas são utilizadas, bem como na estocagem do produto, por processos de oxidação iniciados pela luz e efeito do oxigênio (AZZI e STOCKER, 2000; CERT et al., 2000). Syavoja et al. (1986), estudando o efeito do refinamento sobre o teor de vitamina E em óleos vegetais, observaram perdas de 10 a 33% de α -tocoferol, 20 a 33% dos demais tocoferóis e aproximadamente 50% de tocotrienóis.

Considerando a importância dos alimentos analisados neste estudo (hortaliças, ovos e óleos) na ingestão diária da população brasileira, é interessante fazer um paralelo entre os resultados aqui obtidos com a quantidade recomendada de vitamina E a ser consumida.

Dessa forma, a contribuição do consumo de hortaliças e óleos analisados para a ingestão diária recomendada de vitamina E é mostrada na Figura 27.

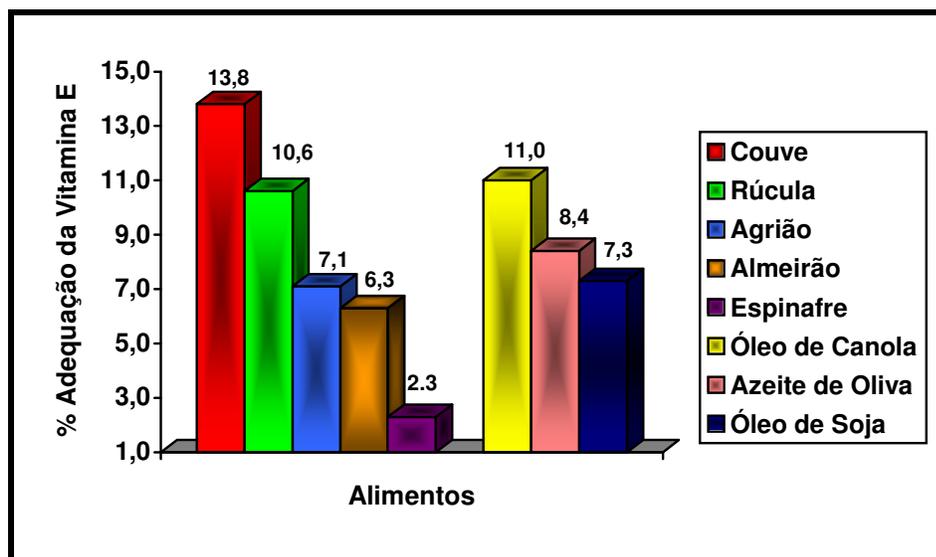


Figura 27. Adequação à ingestão dietética de referência para vitamina E (considerando os teores de α -tocoferol) a partir do consumo de hortaliças e óleos.

Para realizar essa comparação, tomou-se como base a recomendação diária de vitamina E para um indivíduo adulto, além de porções de hortaliças e óleos que são indicadas pela Pirâmide de Alimentos,

um guia alimentar já bem estabelecido. A adequação pôde ser calculada portanto, a partir da recomendação de 15 mg de α -tocoferol/dia e a ingestão de 3 porções de hortaliças folhosas e 1 porção de óleo ao dia. Para isso, 60 g de hortaliças e 9 gramas para óleos foram porções médias utilizadas para esse cálculo (PHILLIPPI et al., 1999; IOM, 2000).

Observa-se pela Figura 24, que a ingestão de alguns folhosos analisados, como a couve e rúcula, em quantidades recomendadas pela Pirâmide, contribui de forma relevante para a adequação dietética de vitamina E. O consumo de couve nas porções utilizadas promove uma adequação de 13,8%, seguida pela rúcula (10,6%), agrião (7,1%) e almeirão (7,0%). O espinafre, pelo menor conteúdo em α -tocoferol obtido neste estudo, promove uma adequação de 2,3%. Os óleos de canola, oliva e soja são importantes para a ingestão diária de vitamina E, pois em pequenas quantidades, fornecem uma adequação relevante.

No entanto, é interessante ressaltar que cada vez mais os especialistas e comitês de alimentação e nutrição tem recomendado o uso moderado de óleos e gorduras e o maior consumo de frutas e hortaliças, para a promoção e manutenção da saúde (TRICHOPOULOU et al., 2001; USDA, 2004).

Nesse sentido, é possível dizer que, embora as hortaliças avaliadas não possuam valor de α -tocoferol semelhante aos óleos, a ingestão freqüente e em quantidades adequadas desses alimentos pode contribuir de forma considerável para a adequação diária.

Portanto, a avaliação dos isômeros da vitamina E em alimentos comumente consumidos pela população, como hortaliças, ovos e óleo, fornece dados importantes sobre o seu valor nutritivo, além de contribuir para a caracterização do potencial antioxidante desses alimentos.

A composição de vitamina E demonstra ser bastante variável, conforme já discutido anteriormente, o que ressalta a importância de estudos de composição de alimentos brasileiros, produzidos e manipulados sob condições locais, que permitam refletir com maior veracidade o consumo dos nutrientes pela população.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Os métodos otimizados para extrair e quantificar os oito compostos da vitamina E nos alimentos analisados foram eficientes e permitiram a obtenção de resultados confiáveis, o que foi considerado um avanço, já que baseou-se em um método original para determinação, apenas, de tocoferóis em cereais infantis extrusados. A detecção e quantificação dos oito isômeros da vitamina E por CLAE foi realizada em apenas duas corridas para cada alimento, utilizando tempos médios de corrida de aproximadamente 20 minutos;
- O método da extração direta com solventes, otimizado para extração dos tocoferóis e tocotrienóis nos alimentos analisados, foi considerado simples e rápido, além preservar os isômeros da vitamina E, quando comparado aos métodos envolvendo saponificação que foram avaliados neste estudo.
- A composição de tocoferóis e tocotrienóis dos alimentos analisados neste estudo variou bastante de acordo com o tipo de alimento. Em geral, os isômeros tocoferóis foram detectados em maior quantidade e frequência; β - e δ -tocotrienol foram os compostos menos encontrados, sendo que este último não detectado em nenhum alimento, a não ser em quantidades traço;
- O α -tocoferol foi o composto predominante em todos os alimentos avaliados, exceto nos óleos de soja e canola.
- O teor de vitamina E dos alimentos preparados nos dois diferentes restaurantes variou consideravelmente, mas não foram diferentes estatisticamente, exceto entre os alimentos crus e cozidos/refogados. A

variação encontrada para os alimentos crus foi considerada resultante da ação de fatores relacionados ao cultivo, intrínsecas ao alimento;

- Entre os vegetais folhosos analisados, a couve apresentou o maior conteúdo em α -tocoferol, seguida pela rúcula, agrião, almeirão e espinafre.
- Entre as hortaliças consideradas como temperos, a salsa apresentou o maior conteúdo em α -tocoferol, seguida pela cebolinha e pimentão;
- Entre os alimentos cozidos e ou refogados, o cozimento de ovos e brócolis nas condições avaliadas parecem não ter provocado grandes perdas dos compostos;
- O processo de refogar aumentou o conteúdo de vitamina E em níveis variados, devido à adição de óleo de soja em quantidades diferenciadas;
- Os óleos vegetais analisados mostraram ser ricos em α -tocoferol, especialmente o azeite de oliva. Os óleos de soja e canola apresentaram teores mais elevados de γ -tocoferol, seguidos pelo α -tocoferol;
- Os alimentos avaliados neste estudo contribuem de forma relevante para a adequação diária de vitamina E, se consumidos em porções adequadas. A maior adequação foi encontrada para a couve, seguida do óleo de canola, rúcula, azeite de oliva, óleo de soja, agrião, almeirão e espinafre.
- Os resultados obtidos neste estudo representam uma grande contribuição para a caracterização nutricional dos alimentos avaliados, uma vez que trabalhos desta natureza são inexistentes no Brasil.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os teores de α -tocoferol aqui determinados, bem como a composição em isômeros, apontam caminhos interessantes para o desenvolvimento de outros trabalhos. Após a conclusão deste estudo e avaliação dos resultados obtidos, pontos interessantes e novos questionamentos surgiram, devendo receber atenção posteriormente, como:

- Caracterização em relação ao teor de vitamina E de outras hortaliças e temperos utilizados no Brasil, como taioba, mostarda, hortelã, manjericão;
- Determinação e quantificação dos compostos da vitamina E dos demais óleos vegetais utilizados no Brasil;
- Avaliação da estabilidade do α -tocoferol em óleos utilizados em processos de fritura;
- Análise de vitamina E em outros tipos de alimentos, como cereais integrais e frutas, especialmente as regionais;
- Avaliação do efeito dos processos de preparação utilizados com frequência em Restaurantes em relação à preservação da vitamina E e outras vitaminas em alimentos preparados;
- Continuidade das pesquisas em relação ao conteúdo e estabilidade de vitaminas em alimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERC – Associação Brasileira de Empresas de Refeições Coletivas. História, objetivos e mercado. Disponível em: <www.aberc.com.br>. Acesso em: 07 de janeiro de 2004.

ABIDI, S. L.; MOUNTS, T.L. Reversed-phase liquid chromatographic separations of tocopherols. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 25-32, 1997.

ABIDI, S. L. Reversed-phase retention characteristics of tocotrienols antioxidants. **Journal of Chromatography A**, v. 844, p. 67-75, 1999.

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 197-216, 2000.

ABIDI, S. L.; RENNICK, K. A. Capillary electrochromatographic evaluation of vitamin E-active oil constituents: tocopherols and tocotrienols. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 379-86, 2001.

ALBALÁ-HURTADO, S.; NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 243-46, 1997.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION - AIN. Nomenclature policy: generic descriptors and trivial names for vitamins and related compounds. **The Journal of Nutrition**, p.8-15, 1979.

AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidants roles. **Progress Lipid Research**, v. 39, p. 231-55, 2000.

BALL, G. F. M. Vitamin E. In: _____. **Bioavailability and analysis of vitamins in foods**. London: Chapman & Hall, 1998. cap. 5, p. 195-239.

BARRERA-ARELLANO, D.; MÉNDEZ, V.R.; VELASCO, J.; RUIZ, G.M.; DOBARGANES, C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 14, p. 1696-702. Nov. 2002.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamin E. In: **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003. Cap. 4, p. 123-64.

BIERI, J.G. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 4, p. 781, April. 2002.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY, F. J.; SALONEN, J. T.; NEUZIL, J.; ZINGG, J.-M.; AZZI, A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 703-16, Oct. 2002.

BRON, D.; AMIS, R. Vitamin E and prevention of atherosclerosis. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.72, n.1, p. 32-7, Jan. 2002.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G.; ACUFF, R.V.; WALTERS, D.N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L.; INGOLD, K.W. Human plasma and tissue α -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 669-84, Oct. 1998.

CAMPOS, F.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Teores de beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p.163-9. Jul/Dez. 2003.

CARLSON, B.; TABACCHI, M. H. Frying oil deterioration and vitamin loss during foodservice operation. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 218-21, 1986.

CERT, A.; MOREDA, W.; CAMINO, M.C.P. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 131-48, 2000.

CHEN, J. Y.; LATSHAW, J. D.; LEE, H. O.; MIN, D. B. α -Tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary α -tocopherol. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 919-22, 1998.

CHING, L.S.; MOHAMED, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3101-05, 2001.

COHN, W. Bioavailability of vitamin E. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 580-85, 1997.

DEVARAJ, S.; TRABER, M. G. γ -Tocopherol, the new vitamin E? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 530-31, 2003.

DIONISI, F.; PRODOLLIET, J.; TAGLIAFERRI, E. Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography/ amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.72, n.12, p.1505 -11, 1995.

DROTLEFF, A. M.; TERNES, W. Determination of *RS,E/Z*-tocotrienols by HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 909, p. 215-23, 2001.

DUGAN, D.E.; BOWMAN, R.L.; BRODIE, B.B.; UDENFRIEND, S. A spectrophotofluorometric study of compounds of biological interest. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 68, p.1-14, 1957.

EITENMILLER, R. R. Vitamin E content of fats and oils - nutritional implications. **Food Technology**, v. 51, n. 5, p. 78-81, May. 1997.

EMBRAPA.Agrobase.Disponível em:
<http://www.embrapa.br/bibliotecas/index.htm>. Acesso em: 14 de abril de 2003.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n.1, p.51-5, 1996.

GIMENO, E.; CASTELLOTE, A. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; DE LA TORRE, M. C.; LOPEZ-SABATER, M. C. Rapid determination of vitamin E in vegetables oils by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 251-54, 2000.

GÓMEZ-CORONADO, D.J.M.; BARBAS, C. Optimized and validated HPLC method for α - and γ -tocopherol measurement in *Laurus nobilis* leaves. New data on tocopherol content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5196-5201, 2003.

GORDON, M. H.; KOURIMSKÁ, L. Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. **Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 175-77, 1995.

HASSAPIDOU, M. N.; BALATSOURAS, G. D.; MANOUKAS, A. G. Effect of processing upon the tocopherol and tocotrienol composition of table olives. **Food Chemistry**, v. 50, p. 111-14, 1994.

HEINONEN, M.; VALSTA, L.; ANTTOLAINEN, M.; OVASKAINEN, M.-L.; HYVÖNEN, L.; MUTANEN, M. Comparison between analyzed and calculated food composition data: carotenoids, retinoids, tocopherols, tocotrienols, fat, fatty acids, and sterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, n. 1, p. 3-13, Mar. 1997.

HOLOWNIA, K. I.; ERICKSON, M. C.; CHINNAN, M. S.; EITENMILLER, R. R. Tocopherols losses in peanut oil during pressure frying of marinated chicken strips coated with edible films. **Food Research International**, v. 34, p. 77-80, 2001.

HORWITT, M. K. Critique of the requirement for vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1003-05, June. 2001.

HU, W.; WELLS, J. H.; SHIN, T.-S.; GODBER, J. S. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from

stabilized rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 12, p. 1653-6, 1996.

HUANG, H.-Y.; APPEL, L. J.; CROFT, K. D.; MILLER III, E. R.; MORI, T. A.; PUDDEY, I. B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 549-55, Sept. 2002.

INDYK, H. E. Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 113, p. 1217-21, Aug. 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 1995-1996 (POF)**. Vol. 2. Consumo alimentar domiciliar *per capita*. Rio de Janeiro: IBGE, 1998. 3v. 140p.

INSTITUTE OF MEDICINE - IOM. **Dietary intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington: National Academic Press, 2000. Disponível em: <<http://www.nap.edu/openbook/030306935/html>>. Acesso em: 15 abril de 2002.

JIANG, Q.; CHRISTEN, S.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N. γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 714-22, 2001.

KAMAL-ELDIN, A.; GÖRGEN, S.; PETERSON, J.; LAMPI, A. M. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 217-27, 2000.

KANG, K. R.; CHERIAN, G.; SIM, J. S. Tocopherols, retinal and carotenes in chicken egg and tissues as influenced by dietary palm oil. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 592-96, 1998.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.605-11, 2003.

KRINSKY, N.I. Human requirements for fat-soluble vitamins, and other things concerning these nutrients. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 317-24, 2003.

LEE, J.; SUKNARK, K.; KLUVITSE, Y.; PHILLIPS, R. D.; EITENMILLER, R. R. Rapid liquid chromatographic assay of vitamin E and retinyl palmitate in extruded weaning foods. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 968-972, 1999.

LEE, J.; KIN, Y.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER Jr., R. R. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and

broccoli using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 3, n. 1, p. 45-57, Feb. 2000.

LIU, M.; WALLMON, A.; OLSSON-MORTLOCK, C.; WALLIN, R.; SALDEEN, T. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 3, p. 700-06, Mar. 2003.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Extraction of fat-soluble vitamins. **Journal Chromatography A**, v. 935, p. 3-11, 2001.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: MACHLIN, L. J. (Ed.). **Handbook of vitamins**. 2th. ed. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 3, p.99-144.

MURPHY, S. P. Dietary References Intakes for the U.S. and Canada: update on implications for nutrient databases. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, p. 411-17, 2002.

MUTALIB, M.S.A.; KHAZA'AI, H.; WAHLE, K.W.L. Palm-tocotrienol rich fraction (TRF) is a more effective inhibitor of LDL oxidation and endothelial cell lipid peroxidation than α -tocopherol in vitro. **Food Research International**, v. 36, p. 405 -13, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Recommended dietary allowances**. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

PERCIVAL, M. Antioxidants. **Clinical Nutrition Insights**, v. 2, n. 3, p. 1 - 4, Oct. 1998.

PHILIPPI, S.T.; LATTERZA, A.R.; CRUZ, A.T.R.; RIBEIRO, L.C. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha de alimentos. **Revista de Nutrição**, v.12, n.1, p. 65-80, Jan/Abr. 1999.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C.; AZEREDO, R.M.C. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p.145-51, 1998.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; PENTEADO, M. V. C.; BRANDÃO, S. C. C.; STRINGHETA, P. C. Stability of B-vitamin in meat prepared by foodservice. 1. Thiamin. **Foodservice Research International**, v. 11, p.33-52, 1999a.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; PENTEADO, M. V. C.; BRANDÃO, S. C. C.; STRINGHETA, P. C. Stability of B-vitamin in meat prepared by foodservice. 2. Riboflavin. **Foodservice Research International**, 11:53-67, 1999b.

PIIRONEN, V.; VARO, P.; SYVÄOJA, E.-L.; SALMINEN, K.; KOIVISTOINEN, P. High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols and its application to diets and plasma of Finnish men. I.

Analytical method. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 53, p. 35-40, 1984.

PIIRONEN, V.; SYVÄOJA, E.-L.; VARO, P.; SALMINEN, K.; KOIVISTOINEN, P. Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 742-46, 1986.

PINCHUK, I.; LICHTENBERG, D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. **Progress in Lipid. Research**, v. 41, p. 279-314, 2002.

PYKA, A.; SLIWIOK, J. Chromatographic separations of tocopherols. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 71-6, 2001.

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

SÁ, M.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chemistry**, v. 83, p.595-600, 2003.

SCOTT, L.W.; GOOD, C.K.; GUGGER, E.T.; TRABER, M.G. Vitamin E bioavailability from fortified breakfast cereal is greater than that from encapsulated supplements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p.86-92, 2004.

SERBINOVA, E. A.; TSUCHIYA, M.; GOTH, S.; KAGAN, V. E.; PACKER, L. 19. Antioxidant action of α -tocopherol and α -tocotrienol in membranes. In: PACKER, L.; FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1992. cap. 2, p.235-42.

SHEPPARD, A.J., PENNINGTON, J.A.T. 2. Analysis and distribution of vitamin E in vegetables oils and foods. In: PACKER, L., FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1992. cap. 1, p.9-31.

SHIN, T.-S.; GODBER, J. S. Improved high-performance liquid chromatography of vitamin E vitamers on normal-phase columns. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 2, Dec. 1993.

SIMONNE, A. H.; EITENMILLER, R. R. Retention of vitamin E and added retinyl palmitate in selected vegetables oils during deep-fat fryng and in fried breaded products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, .v. 46, p. 5273-77, 1998.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**. New York: Wiley, 1979. 863p.

SRIDHAR, R.; LAKSHMINARAYANA, G. Lipid classes, fatty acids, and tocopherols of leaves of six edible plant species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 61-63, 1993.

SYVÄÖJA, E.-L.; PIIRONEN, V.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, P.; SALMINEN, K.; Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: dairy products and eggs. **Milchwissenschaft**, v. 40, n. 8, p. 467-69, 1985.

SYVÄÖJA, E.-L.; PIIRONEN, V.; VARO, P.; KOIVISTOINEN, P.; SALMINEN, K.; Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 3, p. 328-30, Mar. 1986.

TORRE, J.; LORENZO, M. P.; MATYNEZ-ALCAZAR, M. P.; BARBAS, C. Simple high-performance liquid chromatography method for α -tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves. New data on α -tocopherol content. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 305-11, 2001.

TRABER, M. G.; COHN, W.; MULLER, D. P. R. 3. Absorption, transport and delivery to tissues. In: PACKER, L.; FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1992. cap. 1, p. 35-51.

TRABER, M. G.; JIALALB, I. Measurement of lipid-soluble vitamins – further adjustment needed? **The Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2013-4, June. 2000.

TRABER, M. G. Vitamin E: too much or to not enough? **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 997-98, June. 2001.

TRICHOPOULOU, A.; NASKA, A.; VASILOPOULOU, E. Guidelines for the intake of vegetables and fruit: the Mediterranean approach. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.71, n.3, p. 149-53, 2001.

TRUMBO, P. R.; YATES, A. A.; SCHLICKE-REMFRO, S.; SUITOR, C. Dietary Reference Intakes: revised nutritional equivalents for folate, vitamin E and provitamin A carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 379-82, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. National Nutrient Database. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2004.

UEDA, T.; IGARASHI, O. Determination of vitamin E and biological specimens and food by HPLC – pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrients Analysis**, v. 7, p. 79-96, 1990.

VAN DEN BERG, H.; VANDER GAAG, M.; HENDRIKS, H. Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.72, n.1, p. 53-9, Jan. 2002.

VERLEYEN, T.; VERHE, R.; HUYGHEBAERT, A.; DEWETTINCK, K.; GREYT, W.D. Identification of α -tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.1, p. 1508-11, 2001.

WYATT, C. J.; CARBALLIDO, S.P.; MÉNDEZ, R.O. α - and γ -tocopherol content of selected foods in the Mexican diet: effect of cooking losses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4657-61, 1998.

YAMAUCHI, J.; IWAMOTO, T.; KIDA, S.; MASUSHIGE, S.; YAMADA, K.; ESASHI, T. Tocopherol-associated protein is a ligand-dependent transcriptional activator. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 295-99, 2001.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.1, p. 1-13, 2003.