

Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A

Delia B. Rodríguez-Amaya y Jaime Amaya-Farfán

Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6121 13081 Campinas, SP, Brasil

RESUMEN. Se evalúan las dificultades inherentes a la determinación de la provitamina A y el estado de desarrollo actual de las metodologías. Se discuten los procedimientos, las ventajas y desventajas, así como las posibles fuentes de error de los métodos. Los métodos de columna abierta se presentan todavía como los más viables. Para los países en desarrollo, no obstante la eficiencia y reproducibilidad de la separación cromatográfica dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del analista. Mediante la técnica de HPLC se obtienen cromatogramas altamente reproducibles, permaneciendo, sin embargo, el problema de transformar las áreas de los picos en concentraciones de provitaminas por razón de la inestabilidad, variabilidad de pureza e indisponibilidad comercial de los patrones de provitamina A. La patronización interna con Sudán, que es estable, promete ser una solución. Para separar los isómeros *cis*, la técnica de columna abierta se vale de la recromatografía. Para la técnica de HPLC, sin embargo, este continúa siendo un problema sin solución. Son tratadas la confirmación de la identidad de las provitaminas y la prevención de la degradación durante el análisis. A pesar de los obstáculos que se presentan, los datos obtenidos son confiables siempre y cuando la aplicación de la técnica analítica sea adecuada y se haga la interpretación correcta de los resultados.

Palabras clave: Determinación de provitamina, HPLC, cromatografía en columna abierta.

INTRODUCCION

Considerando que la deficiencia de vitamina continúa siendo un serio problema de salud pública para la mayoría de los países en desarrollo, es de urgente necesidad adquirir más información sobre toda fuente, efectiva o en potencial, de este nutriente. Las provitaminas (carotenoides que pueden ser biológicamente transformados en vitamina) contenidas en alimentos de origen vegetal proporcionan la mayor parte de la vitamina ingerida a precio más bajo que las fuentes de origen animal con vitamina preformada (retinol, éster de retinilo, retinal, 3-deshidroretinol y ácido retinoico).

SUMMARY. Present state of the analytical methodologies for provitamin A determination. The difficulties inherent to provitamin A determination and the present state of development of the analytical methodologies are appraised. The procedures, the advantages and disadvantages and the possible sources of error of the methods involved are discussed. Open-column methods are still the most viable option in developing countries but the efficiency and reproducibility of the chromatographic separation depend largely on the analysts skill and experience. Although HPLC chromatograms are highly reproducible, the problem is to transform the peak areas to provitamin A concentrations because of the instability, varying purity and unavailability of provitamin standards. Internal standardization with the stable Sudan appears to be a promising solution. Separation of *cis*-isomers requires rechromatography in open-column systems. For HPLC, this problem still remains to be solved. Confirmation of the identity of the provitamins and prevention of degradation during the analysis are also dealt with. Notwithstanding the obstacles involved, reliable data can be obtained with adequate application of the analytical techniques and proper interpretation of the results.

Key-words: Provitamin determination, HPLC, open-column chromatography.

Hace ya muchos años vienen acumulándose datos e informaciones sobre la determinación cuantitativa de las provitaminas; sin embargo, debido a dificultades analíticas inherentes, la mayoría de esos resultados son incoherentes o no confiables (1), restando todavía mucho trabajo para que tal volumen de información pueda considerarse como suficiente o satisfactoria (2). Los carotenoides son compuestos poliénicos, liposolubles responsables por atraerentes colores que se extienden del amarillo al rojo, característicos de muchos alimentos. Químicamente estos se dividen en dos grupos: los hidrocarburos y los derivados oxigenados. Los miembros del primer grupo son

universalmente conocidos como carotenos, mientras que los del segundo son llamados xantofilas.

Desde el punto de vista nutricional, los carotenoides puede ser activos o inactivos. Para que un carotenoide tenga actividad vitamínica, es necesario que posea, por lo menos, la mitad de la molécula de β -caroteno; o sea, un anillo de β -ionona no substituido y la cadena lateral poliélica de once carbonos. Así, los carotenos, ζ -zeacaroteno, δ -caroteno y licopeno, y las xantofilas zeinoxantina, luteína y violaxantina, son todos carotenoides inactivos (Figuras 1 y 2). Por otro lado, los carotenos α -caroteno, β -zeacaroteno y γ -caroteno, y las xantofilas α -y β criptoxantinas poseen aproximadamente la mitad de la actividad del β -caroteno (Tabla 1). Siendo algunos carotenos inactivos y algunas de las xantofilas activas, es entonces incorrecto denominar un capítulo o sección dedicado al valor vitamínico A de "carotenos en alimentos".

PROBLEMAS EN LA DETERMINACION DE PROVITAMINA A

Existen varios factores que dificultan la obtención de datos confiables sobre provitamina A: 1) el gran número de carotenoides naturales, 2) las muestras de alimentos pueden

variar ampliamente, tanto cuantitativa como cualitativamente; 3) solamente algunos carotenoides son precursores de la vitamina y las actividades son diferentes; 4) por el hecho de ser compuestos altamente insaturados, el deterioro por isomerización y oxidación puede fácilmente ocurrir durante el análisis.

Independiente del método utilizado, para determinar el contenido exacto de provitamina A, los siguientes requisitos deberían ser llenados: 1) separar o eliminar los carotenoides inactivos interferentes; 2) separar y cuantificar individualmente las provitaminas; y 3) tomar las debidas precauciones para evitar la formación de artificios y pérdidas cuantitativas durante el análisis.

A medida que estas exigencias son cumplidas, sin embargo, la ejecución del análisis se torna más difícil y se hace necesaria la introducción de simplificaciones. Este enfoque puede ser aceptado siempre y cuando no traiga errores significativos.

Hace algunos años la vitamina A de alimentos de origen vegetal solía calcularse usándose el contenido total de carotenoides. En muchos alimentos, no obstante, el contenido de carotenoides inactivos es grande, no siendo raro el caso en que el carotenoides predominante sea uno de los inactivos.

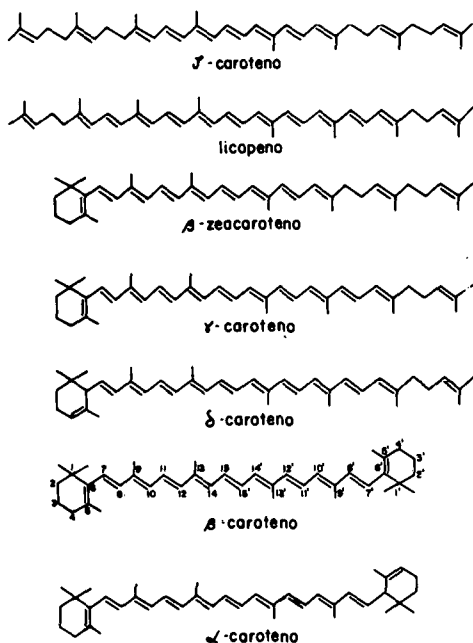


FIGURA 1

Estructuras de los carotenos comunes

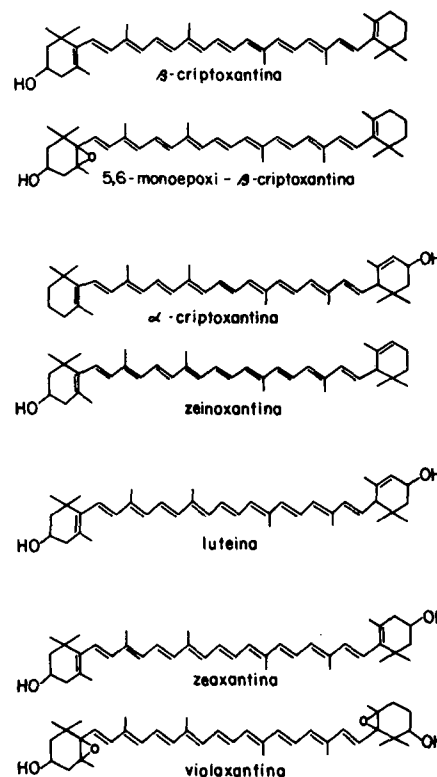


FIGURA 2

Estructuras de las xantófilas comunes

Posteriormente, el valor pasó a ser calculado usándose como base la fracción de β -caroteno. Esa aproximación fue más apropiada considerándose que se trata del carotenoides más ampliamente distribuido y que posee la más alta actividad provitaminica. En algunos alimentos, sin embargo, cantidades significativas de otras provitaminas A se encuentran presentes afectando considerablemente el valor vitamínico final. Además, la así denominada 'fracción β -caroteno' frecuentemente contiene también carotenoides menos activos y hasta inactivos.

De la discusión anterior se infiere que la separación cromatográfica debe ser parte esencial de la determinación de provitamina A.

Por más que la cromatografía en capa fina haya sido muy útil en el análisis cualitativo, especialmente cuando se desea seguir el curso de reacciones químicas, esta técnica ha tenido poca aplicabilidad en la cuantificación debido a la posibilidad de isomerización y degradación en una superficie altamente expuesta (3) y a la dificultad de retirar completamente los carotenoides separados para cuantificación. No obstante la cromatografía en gas líquido haya sido de éxito en la elucidación de estructuras (4), esta técnica no es apropiada para el análisis cuantitativo de carotenoides debido a su termolabilidad y escasa volatilidad, lo que demandaría su derivación química. El método tradicional para separar carotenoides es la cromatografía descendente en columna (flujo por gravedad auxiliado con trompa de vacío). La separación es acompañada visualmente y las fracciones se cuantifican en el espectrofotómetro. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica considerada como la más avanzada en la actualidad, sin embargo, aún necesita ser patronizada en varios aspectos antes que pueda ser usada rutinariamente para la determinación de provitamina A.

El cuadro, aparentemente confuso debido a la complejidad y variabilidad en la distribución de los carotenoides, puede ser un tanto simplificado. Usando la distribución de los carotenoides que hoy se conoce en los alimentos, algunas características pueden discernirse las cuales pueden facilitar la escogencia de la metodología a ser empleada, especialmente en lo tocante a la separación cromatográfica. Según la composición de las provitaminas A, los alimentos de origen vegetal pueden dividirse en tres grupos principales: 1) aquellos en los cuales el valor de vitamina es debido casi exclusivamente al β -caroteno (p.e., verduras foliares, arvejas, brócoli, batata dulce, tomate, guayaba de pulpa roja, sandía y mango); 2) los que tienen el α - y β -caroteno como principales contribuyentes (p.e., zanahoria, algunas variedades de calabazas, aceite de palma); 3) aquellos en que la β -criptoxantina y el β -caroteno son los principales carotenoides activos (p.e., marañón, melocotón, kaki, loquat o níspera, (*Cyphomandra betacea*), algunas veces acompañados por cantidades apreciables de 5,6 o 5,8 monoepoxi- β -criptoxantina

(criptoflavina), (p.e., papaya *Spondias lutea* o cajá). Conjuntamente, otras provitaminas también pueden estar presentes pero en tan poca concentración que no afectan significativamente el valor de vitamina A (1). Por ejemplo, las verduras foliares algunas veces contienen α -caroteno y/o β -criptoxantina; el tomate la guayaba roja γ -caroteno pero, debido a las cantidades, sus aportes son ínfimos. En el mango, la criptoxantina también contribuye cerca de 2 a 4% del valor de vitamina A, aporte que, dependiendo de la exactitud deseada, puede ser despreciable. Además, los precursores β -zeacaroteno, 5,6- monoepoxi- β -caroteno y mutacromo (5,8- monoepoxi- β -caroteno) son ocasionalmente encontrados en alimentos en cantidades ínfimas.

En razón de la conocida inestabilidad de los carotenoides, deben ser tomadas medidas de precaución rutinariamente en el laboratorio. Entre estas merecen destacar: 1) el uso de solventes de grado analítico o destilados, libres de impureza destructivas (p.e., éter etílico y tetrahidrofurano libres de peróxidos, cloroformo libre de ácido); 2) protección contra la luz y el calor p.e., trabajando con poca luz evitándose el calentamiento; 3) tiempos de análisis cortos; 4) aplicación de atmósferas inertes (p.e. cambiando el aire del recipiente por N_2); y 5) utilización de agentes antioxidantes y neutralizantes ($MgCO_3$).

Una sistemática recomendable es analizar las muestras inmediatamente después de recibidas y proseguir hasta el fin, sin interrupción. Cuando esta rutina es seguida, el uso de $MgCO_3$, BHT o pirogalol durante la extracción no se hace necesario (5). Según Edwards Lee (6) arvejas verdes dejadas en reposo durante dos horas después de homogeneizadas pueden perder hasta 68% de los carotenoides totales, tal vez mediante acción enzimática. En contraposición a cualquier argumento, nuestra experiencia muestra consistentemente que el almacenamiento de extractos o fracciones, aunque sea a baja temperatura produce alteración de los carotenoides. Fue también la experiencia que nos enseñó a no dejar los carotenoides en acetona por más tiempo de lo estrictamente necesario para la extracción y transferencia con éter de petróleo.

La presencia de carotenoides cis y epoxi-derivados son un buen índice de que los cuidados para evitar la isomerización y oxidación no son suficientes. Al reportar estos compuestos, el autor debe asegurarse de que los mismos no son productos artificiales del análisis.

Uno de los pasos que últimamente ha sido objeto de controversias es la saponificación considerada el mejor camino para eliminar las clorofilas, lípidos indeseables e hidrolizar ésteres de carotenoides (3, 7). Khacik et al. (8), por un lado, reportaron que saponificando los carotenoides de brócoli crudo con solución metanólica de KOH al 30%, a temperatura ambiente por 3 horas en atmósfera de N_2 , se pierde el 6% de la fracción β -caroteno y de 18 a 84% de

otros carotenoides. Por otro lado, Bushway y Wilson (9) no notaron diferencia alguna en las concentraciones de α - y β -caroteno de muestras saponificadas y no saponificadas (detalles no suministrados). Baranyai et al. (10) afirmó que no hubo pérdida de carotenoides durante la saponificación de un extracto de paprica con solución metanólica de KOH al 30%, temperatura ambiente, atmósfera de N_2 , por 16 horas. Tampoco hubo pérdida de las provitaminas α -, β - y γ -caroteno en calabaza, tallo y tomate cuando los carotenoides en éter de petróleo fueron saponificados con un volumen de KOH al 10%, a temperatura ambiente, durante la noche (5). No obstante, en un estudio comparativo de seis procedimientos de saponificación, fue comprobado que tanto las pérdidas cuantitativas como la formación de artefactos (isómeros cis epoxicarotenoides) ocurren y su incidencia aumenta con la temperatura y la concentración de KOH (11). La magnitud de la degradación varió para diferentes carotenoides, siendo las provitaminas considerablemente más resistentes que la luteína, violaxantina neoxantina. Las pérdidas de carotenoides se reducen realizando la saponificación en frío (temperatura ambiente), en atmósfera de nitrógeno, o en la presencia de pigalol.

Con muestras que contengan apocarotenales, debe asegurarse la eliminación previa de toda la acetona, pues cualquier residuo de acetona se condensará aldólicamente con esos carotenoides formando metil cetonas (12, 13).

METODO DE LA AOAC

Un método ampliamente usado para determinar el contenido de provitamina A es el método 43.014 de la AOAC (14), introducido en su forma actual para carotenos en plantas en 1955. Este comprende la extracción con acetona/hexano, filtración, lavado (5 veces) con agua y aferición del volumen con hexano. La solución es aplicada a una columna de MgO activado: Hyflosupercel. Los "carotenos" son eluidos con el sistema acetona/hexano, la absorbancia medida a 436 nm y el resultado expresado en mg de β -caroteno o en U.I.

Si bien su simplicidad lo hace muy atrayente, el método ha sido bastante criticado por no ser apropiado para determinar provitamina A en alimentos, con la posible excepción de las hortalizas verdes. Presúmese que la fracción obtenida de la columna es β -caroteno o por lo menos, principalmente β -caroteno. En realidad, para alimentos de composición más compleja, el eluato podrá contener también las provitaminas menos activas α -caroteno, β -zeacaroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y γ -caroteno, así como los carotenoides inactivos ζ -caroteno, δ -caroteno, α -zeacaroteno zeinoxantina (5). Con estas consideraciones no es difícil ver que el valor de vitamina de ciertos productos vegetales sería ampliamente superestimado. El valor estimado llega a ser más que el doble de lo real en papaya, donde la principal provitamina

es la β -criptoxantina y todavía existen cantidades apreciables de 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, así como en ciertos tipos de calabazas, las cuales contienen cantidades substanciales de α -caroteno.

Otras dos posibles fuentes de error en el método de la AOAC pueden ser señaladas. Se pide un volumen fijo de solvente de extracción, sin tomar en cuenta la variación que existe entre muestras de diverso tenor de carotenoides. El trabajar con carotenoides exige que la extracción de la muestra sea repetida hasta obtenerse un extracto incoloro. Por otro lado, el método mide la absorbancia a 436 nm que no es el máximo de absorción del β -caroteno, como ya fue observado por Simpson (15).

METODOS RECOMENDADOS POR LA COST

Reconociendo las diferentes matrices en que se encuentran los carotenoides, la COST 91 (European Cooperation in Scientific and Technological Research) recomienda tres procedimientos para: A) "carotenos" en alimentos complejos; B) "carotenos" naturales totales en frutas, hortalizas material vegetal in natura; y C) "carotenos" en bebidas (16).

En el procedimiento A, la muestra es sometida a saponificación cerca de 60°C, por 30 minutos, con solución de KOH, etanol, éter de petróleo e hidroquinona, aplicándose agitación ocasional. Después de enfriar, los pigmentos son transferidos con éter etílico adicionándose agua y agitándose vigorosamente. Ya separadas las fases, se toma una porción de la fase etérea se retira de ella la alcalinidad con agua saturada de éter y se evapora finalmente en rotavapor a 40°C

Según el procedimiento B, el material vegetal seco es dejado durante una noche en hexano/acetona bajo atmósfera de nitrógeno, saponificase con solución metanólica de KOH a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de adicionar agua, se agita y se dejar separar la fase de hexano. Se mide este volumen y una fracción es evaporada completamente. El material vegetal fresco es extraído tres veces con acetona. Los extractos son filtrados, combinados y su volumen determinado. Una porción es colocada en un embudo de separación con KOH y después de vigorosa agitación y reposo de 30 minutos, se adiciona hexano. Después de nueva agitación, la acetona y el KOH son lavados tres veces con agua.

La muestra de bebida en el procedimiento C es agitada fuertemente con cloroformo por 30 minutos. La emulsión resultante es centrifugada, la fase acuosa descartada por aspiración, la fase clorofórmica filtrada y una porción es evaporada para análisis.

En todos los procedimientos, las huellas de agua son eliminadas adicionándose etanol y evaporando. El residuo de etanol es después retirado con hexano, solvente en el cual son finalmente dejados los carotenoides. La solución es

entonces aplicada a una columna de alúmina desactivada y eluida con hexano hasta que el eluato no contenga más pigmento. La absorbancia es medida en longitud de onda próxima a 450 nm. El éter de petróleo puede ser usado en lugar de hexano. El contenido de β -caroteno es calculado usándose $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2590$ en hexano, o 2600 en éter de petróleo. La recuperación promedio reportada para el procedimiento A es de 95%.

Los métodos de la COST presuponen que las cantidades de α -caroteno que salen eluidas junto con el β -caroteno, así como las criptoxantinas dejadas en la columna son insignificantes. El valor de vitamina A de fuentes que contienen α -caroteno (como la calabaza) será luego superestimado, mientras que aquellas que contienen α o β -criptoxantina (como la papaya) tendrán sus valores subestimados. Tales métodos son entonces apropiados solamente para muestras que contengan cantidades despreciables de provitamina A que no sean β -caroteno. Por otra parte, los métodos son laboriosos y pueden ser simplificados. Por ejemplo, la evaporación repetitiva para retirar los vestigios de agua puede ser substituida por la adición de sulfato de sodio anhídrido.

Debemos enfatizar además que, si bien los métodos de la AOAC y COST usan la columna clásica (o abierta), ninguno de los dos se propone a separar las provitaminas. Luego, es incorrecto usar el desempeño del método de la AOAC para demostrar que la técnica de la columna abierta es un método de separación ineficiente frente a la HPLC, como afirman frecuentemente los proponentes de esta técnica.

MÉTODOS DE COLUMNA ABIERTA

La cromatografía descendiente en columna con flujo por gravedad, recientemente llamada de "cromatografía en columna abierta" (OCC), es el método clásico usado para determinar la composición de carotenoides de alimentos. Los materiales absorbentes más comúnmente usados son el MgO:Hyflosupercel en varias proporciones y alúmina neutra desactivada. La gel de sílica (ácido silícico) no es un adsorbente aceptado porque su acidez inherente puede causar degradación o isomerización de los carotenoides (17-19). Se ha visto que el MgO es el material que menos causa alteraciones en los carotenoides aunque lo contrario también fue observado en MgO activado de acuerdo con el método de la AOAC (20). De las muchas combinaciones de solventes utilizadas en la elución, las más comunes son el éter de petróleo o hexano con varias concentraciones de éter etílico, acetona o benceno. Esta técnica (21) ha sido empleada en nuestro laboratorio por varios años para determinar la composición cuantitativa de carotenoides en alimentos brasileños (22-35) y para acompañar los cambios durante el procesamiento o el almacenamiento (36-37). A partir de las composiciones obtenidas, la cantidad de cada provitamina, considerando su respectiva actividad, es usada

para calcular el valor de vitamina A. Nuestro procedimiento ha sido también usado por otros laboratorios en el Brasil (38-42).

Si el único objetivo del analista es determinar el valor de vitamina A de una cierta fuente, el método clásico para carotenoides puede ser considerablemente simplificado (5). La versión simplificada consiste en macerar la muestra (la cantidad depende del contenido de cada material, p.e., 5 g para tallo, 10 g para tomate, 20 g para papaya) con acetona a 4 ó 5°C y celite en batidora (waring blender) o homogenizador (sin fugas) con vaso de vidrio o acero inoxidable, durante 1 o 2 minutos, seguido de un paso de filtración en embudo Büchner o de vidrio sinterizado ordinario. Para aumentar la extractabilidad de algunos tejidos resistentes a la penetración del solvente, como son las hortalizas, se coloca la muestra finamente picada previamente en acetona por 20 minutos en la heladera; otros tejidos como la calabaza y el maíz pueden ser homogeneizados con pequeñas cantidades de agua antes de la extracción. La extracción y filtración deben ser repetidas dos o tres veces hasta que el residuo aparezca sin color.

Los carotenoides son trasferidos con éter de petróleo de forma suave gradual en un embudo de separación. Para evitar la formación de emulsión, la cual es difícil de deshacer y ocasiona pérdidas de pigmento que pasan para la fase acuosa, se adiciona la solución acetónica en varios tiempos al éter de petróleo que se encuentra en el embudo. Después de cada incremento, se agrega agua contra la cara interna de la pared del embudo de tal forma que no haya agitación. Una vez separadas las fases, se descarta la inferior y se repite el proceso con un nuevo incremento del extracto cetónico. Cuando todo el extracto se encuentra en el embudo, se lavan otras cuatro o cinco veces con agua para retirar la acetona residual. La fase de éter de petróleo con los carotenoides es después secada con NaSO_4 anhídrido y concentrada en un rotavapor a menos de 35°C.

El concentrado es aplicado como una cobertura delgada al extremo superior de una columna de MgO:Hyflosupercel (1:1) previamente embebida en éter de petróleo. La cromatografía se desarrolla con los siguientes eluyentes (sendas porciones de 50 ml) éter de petróleo, 1, 2 y 5% de éter etílico en éter de petróleo y 1, 2, 5 y 8% de acetona en éter de petróleo. Uno o más de esos pasos pueden ser omitidos o los volúmenes adaptados dependiendo de los carotenoides presentes en la muestra.

La columna de vidrio (2 d.i. x 20 cm) es empacada primero colocando un tapón de lana de vidrio en el fondo y después llenándola con el adsorbente hasta una altura de 1.5 cm (14). Mientras se aplica succión a la salida de la columna por intermedio de un sistema de matraz-trompa de vacío, la parte superior es presionada levemente con un instrumento plano (p.e. un corcho insertado por la base menor con una varilla de alambre) hasta disminuir la altura a 10 cm. Sobre la superficie plana de la columna colócase

una capa de 1 cm de Na_2SO_4 anhidro. La succión es mantenida durante toda la cromatografía. La separación de los carotenoides es seguida visualmente y cada banda correspondiente a las provitaminas es colectada separadamente y transferida a un balón volumétrico. Debido al efecto del solvente en la absorbancia, es necesario lavar cuatro veces con agua aquellas fracciones que contienen acetona y secar con Na_2SO_4 antes de colocar en el balón volumétrico. El volumen se completa con éter de petróleo y se toma el espectro entre 550 y 350 nm (cubeta de 1 cm). La concentración de cada provitamina se calcula usando la absorbancia máxima y la absorptividad respectiva tabulada (7), según la expresión:

$$\text{Provitamina (ug/g)} = \frac{\text{Abs. Max.} \times \text{Vol. (ml)} \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times \text{Peso de la muestra (g)}}$$

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ es 2800 para α -caroteno. 2592 para β -caroteno y 2386 para criptoxantina en éter de petróleo.

A pesar de que el método de columna con flujo por gravedad ha sido llamado de "complicado" en la literatura, su simplicidad puede ser demostrada considerando los tres grupos antes mencionados. Para el 1º grupo, la elución termina con la salida de la primera banda anaranjada, que es el β -caroteno y el cual es desplazado con éter de petróleo puro (o con solución de 5% de éter de petróleo, dependiendo de su concentración). Para el 2º grupo, α -caroteno el cual eluye antes que el β -caroteno, las dos bandas son colectadas separadamente. En los dos casos, todos los demás carotenoides (y clorofilas cuando están presentes) quedan retenidos en la columna.

La situación es menos simple cuando se considera el tercer grupo. Los hidroxicarotenoides en frutas se encuentran principalmente esterificados con ácidos grasos. Antes de la cromatografía es menester saponificar el extracto para obtener los carotenoides libres. La fracción de β -criptoxantina es eluida después del β -caroteno y, por tanto, la cromatografía debe extenderse inclusive hasta la eliminación de algunos carotenoides inactivos que interfieren. En el caso de la *Spondias lútea*, por ejemplo se eluye primero el α -caroteno, seguido del β -caroteno, ζ -caroteno, zeinoxantina, β -criptoxantina y criptoflavina; así, solo las fracciones 1, 2, 5 y 6 son colectadas y cuantificadas. En el loquat, el orden de elución es β -caroteno, ζ -caroteno, neurosporeno, β -criptoxantina y 5,6-monoepoxi- β -criptoxantina, de los cuales apenas las fracciones 1, 4 y 5 tienen actividad (la última se encuentra en cantidades tan bajas que puede ser despreciada). En algunos cultivares de papaya de pulpa roja, el 5,6 -monoepoxi- β -criptoxantina contribuye entre 13 y 16% del valor de vitamina A total y debe entonces ser recogido y cuantificado. Los carotenoides como licopeno, luteína, violaxantina, zeaxantina y neoxantina, que se encuentran en grandes cantidades en algunos alimentos, se absorben fuertemente a la columna y no son eluidos. Si se desea la composición completa de las

provitaminas, esta técnica permite la separación y cuantificación de todas ellas, incluyendo las menos expresivas, siempre que no importe la prolongación y complicación del análisis.

La saponificación es también necesaria para eliminar lípidos indeseables de muestras aceitosas. La mejor manera de realizar esta operación es adicionando un volumen de KOH metanólico al 1% después de haber transferido los carotenoides al éter de petróleo. La reacción se realiza durante la noche, en la obscuridad y a temperatura ambiente. Después de lavar cinco veces con agua y secar con Na_2SO_4 , la solución de carotenoides es concentrada para ser aplicada a la columna. Dependiendo de las condiciones, especialmente alta temperatura y concentración de KOH, la saponificación puede producir degradación y compuestos artificiales (11).

Los absorbentes encontrados comercialmente suelen variar en su capacidad adsorptiva y la más pequeña cantidad de impurezas puede alterar el poder de elución del solvente. Si bien las variaciones de calidad son mayores entre fabricantes, ellas también existen entre lote y lote y son más notables en los países en desarrollo.

Por lo tanto, no debería sorprender si en su primera tentativa un laboratorio no logra reproducir las separaciones reportadas en la literatura; esto apenas significa que algunas medidas de ajuste deben ser tomadas. La capacidad adsorptiva puede ser aumentada activando el adsorbente a 110°C durante 4 h, o disminuida elevando la proporción del Hyflosupercel (p.e., 1:2). Los volúmenes de elución también pueden ser modificados. Por ejemplo, para aumentar la separación entre el α - y β -caroteno, puede usarse $\text{MgO}:\text{Hyflosupercel}$ (1:1) activado, o aumentarse el volumen de los solventes iniciales. Afortunadamente, el hecho de que los carotenoides poseen color permite, la visualización de las bandas, lo que facilita las separaciones.

En muestras que contienen cantidades apreciables de isómeros cis, es probable que estos tengan que ser separados de los trans debido a la menor actividad biológica que los primeros poseen (p.e., el 13-cis- β -caroteno tiene 53% y el 9-cis- β -caroteno apenas 38% de la actividad del trans- β -caroteno). Para separar los isómeros, las fracciones de provitaminas A obtenidas en la columna de $\text{MgO}:\text{Hyflosupercel}$ son recromatografiadas individualmente en columna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, marca Mallinkrodt (43) y desarrollada con varias concentraciones de éter etílico en éter de petróleo (33). Sweeney Marsh (44, 45) recomendaron el uso de una columna de dos fases (3 cm $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y 7 cm $\text{Mg}(\text{OH})_2$: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1:6) y desarrollaron con 0,5% y 1,5% de p-metilanisol en éter de petróleo para α - y β -caroteno, respectivamente.

Tsai et al. (46), propusieron el empleo de una columna abierta reciclable, rellena con material RP- C_{10} (50 μm) para HPLC preparativa, eluida isocráticamente con acetonitrilo-

metanol-cloroformo (47:47:6) y flujo forzado con N_2 como alternativa para el uso del aparato de HPLC en laboratorios de escasos recursos. Para evitar el empleo de acetonitrilo, solvente tóxico y caro, la elución también puede ser efectuada con acetona con concentraciones decrecientes de agua (15, 10, 0%), lo cual mejora la recuperación de β -caroteno (47). Este sistema es recomendable sólo para hortalizas, siendo el orden de elución xantofilas, clorofilas y β -caroteno. Para otros alimentos, el método no ofrece separación eficiente: los α - y β -carotenos no se separan, o lo hacen a duras penas, el licopeno se difunde por la columna mezclándose con el β -caroteno y la β -criptoxantina (47). Las variaciones que se encuentran entre los métodos de columna abierta fueron descritas por Simpson et al. (48).

MÉTODOS POR HPLC

Como ocurre en otras áreas, la HPLC es considerada como lo más avanzado que existe para determinar provitamina A. La mayor parte de los métodos utilizan columnas de fase inversa (RPC_{18}) (9, 49-58). El MgO no es suficientemente estable dentro de la columna para HPLC (59), no obstante háyase mostrado eficiente en la separación de los carotenoides de frutas cítricas (60, 61). Igual que en la OCC, sospéchase aquí que la sílica promueva degradación de los carotenoides dentro de la propia columna (62).

Las fases móviles más comunes son combinaciones de acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, metanol y hexano usados isocráticamente. La elución con gradientes requiere largos períodos para restablecer el equilibrio después de cada corrida (49, 63), aún cuando el tiempo puede ser reducido a 1 min. con cartuchos de C_{18} en módulos radialmente comprimidos y un sistema de solvente con 3% de agua hasta 10% de tetrahidrofurano en metanol (15).

Las muestras de alimentos suelen requerir el cambio frecuente del material de las precolumnas, o de su lavado con metanol cloruro de metileno/hexano (50, 64).

Varias son las ventajas enumeradas para los métodos por HPLC: 1) rapidez; 2) simplicidad; 3) reproducibilidad; 4) menor exposición al oxígeno, luz, adsorbente y solvente; 5) exactitud; 6) separación eficiente y 7) sensibilidad.

Observando la literatura con atención, sin embargo se aprecia que ningún método de HPLC es todavía aceptado de forma general, permaneciendo así esta poderosa técnica apenas en potencial dentro del área.

Casi todo trabajo de HPLC comprende una demorada preparación de la muestra, los resultados se refieren frecuentemente apenas al β -caroteno (aún en alimentos que contienen cantidades apreciables de α -caroteno y β -criptoxantina), además de presentar datos ampliamente divergentes (1). Estas fallas, obviamente irán siendo

corregidas a medida que aumenten nuestros conocimientos sobre la aplicación del método al análisis de la provitamina A. En los países en desarrollo permanecerá todavía el problema del alto costo del instrumento y su mantenimiento.

La cuantificación en HPLC puede ser problemática ya que se requiere tanto de resolución óptima y de correcta calibración con patrones adecuados. Como los carotenoides poseen diferentes coeficientes de absorptividad y máximos de absorción en longitudes de onda diferentes (Tabla 1), la normalización interna y el cálculo de los picos en porcentaje del área total son datos que conducen a errores numéricos. La calibración con un patrón externo presenta algunos problemas ya que la constante inyección de patrones confiables se hace necesaria. Solamente el α y β -carotenos son encontrados en el comercio y además de eso, Quackenbush y Smallidge (55), encontraron una variación en el porcentaje de trans- β -caroteno de 0,6 a 88,7% entre seis de los distribuidores más importantes. Por otro lado y a pesar de las frecuentes afirmaciones de que las soluciones patrones son estables por semanas o meses, nuestra experiencia y la de otros investigadores (55, 65) indica que los patrones sufren rápida degradación después de abierto el recipiente sellado. Las soluciones patrón deben ser usadas recién preparadas, tener su concentración verificada por espectrometría y su pureza por TLC. Los patrones para otras provitaminas, como no se encuentran en el comercio, son obtenidos de fuentes naturales purificados por OCC o, alternativamente, colectadas después de repetidas operaciones de HPLC. Cualquiera de las dos alternativas, sin embargo, complica y demora el análisis.

Si bien los patrones de provitaminas son también requeridos en la determinación inicial de los factores de respuesta, la calibración con patrón interno tiene la ventaja de que los inestables patrones de provitaminas no son necesarios con la misma frecuencia que en el caso de la patronización externa. Decapreno- β -caroteno (64) y Sudan I (55) ya fueron recomendados como patrones internos. El primero es un carotenoide C_{50} que contiene dos unidades isoprénicas más que el β -caroteno, no es un compuesto natural, es más estable que el α - y β -carotenos pero no está disponible comercialmente (no obstante los autores afirman que el compuesto es de fácil síntesis industrial). El segundo es un producto que no se amolda a la regla de que el patrón la substancia en análisis deben tener estructuras similares. Su uso es válido por ser estable, y comercialmente disponible, además de cumplir con los requisitos fundamentales de longitud de absorción máxima, solubilidad semejante y no interferencia en sistemas cromatográficos de fase inversa. Es menester, sin embargo, retirar antes de la cromatografía las clorofilas, los dihidro y polioxocarotenoides porque estos son eluidos en la misma posición del Sudán I.

Una ventaja obvia de la HPLC sobre la cromatografía en columna abierta es la mayor reproducibilidad de la separación. Con la OCC esto depende principalmente de la habilidad del técnico en rellenar la columna y visualizar las bandas.

Teóricamente, la alta capacidad de resolución de la HPLC (66) debería permitir la determinación completa de la composición de provitamina sin tener que recurrir a la recromatografía, como ocurre con la técnica de columna abierta, en especial para los isómeros *cis*. En la práctica, sin embargo, tal grado de eficiencia no se manifiesta (1).

Bushway (51) usó cuatro columnas comerciales RP-C₁₈, cinco sistemas de solvente para fase inversa, así como columnas de alúmina y amina. Sus cromatogramas mostraron la dificultad que existe en separar los diferentes carotenoides y los isómeros *cis* y *trans*. Debido a la complejidad de la composición de los carotenoides, el autor expresó dudas de si un método cualquiera de HPLC sería capaz de cuantificar las principales provitaminas de toda fruta y verdura.

Quackenbush Smallidge (55) experimentaron mas de 20 columnas comerciales, entre C₁₈ y C₈, y solamente tres mostraron alguna separación de los isómeros *cis* y *trans* del β-caroteno, siendo la Vydac TP-201 la más efectiva. La elución se efectuó con gradiente discontinuo de metanol hasta metanol:cloroformo (94:6), o isocráticamente con metanol:cloroformo (94:6). Ese sistema fue probado con algunas muestras de alimentos para cuantificar tan sólo los isómeros *cis* y *trans* del β-caroteno, aun así, apenas en términos relativos (67).

Una buena separación de los isómeros *cis* del β-caroteno fue obtenida con una columna de Ca(OH)₂ rellena en laboratorio y desarrollada con acetona al 0,1 o 0,5% en hexano (68) o con acetona:hexano (3:97) (69). Este último sistema fue aplicado a muestras de alimentos pero los valores absolutos de cada isómero no fueron dados, siendo imposible comparar un alimento con otro, además de no haber sido consideradas las otra provitaminas.

El contenido de provitamina A de algunas muestras de alimentos fue determinado usándose cromatografía en columna de MgO:Hyflosupercel y HPLC en fase inversa, con cuantificación por patronización externa o interna con Sudán I (70). Los resultados mostraron que cualquiera de las técnicas puede ser usada siempre y cuando el análisis proceda en condiciones óptimas. El mejor camino es usar HPLC con patronización interna complementado con el método de columna abierta.

CONFIRMACION DE LA IDENTIDAD DE LAS PROVITAMINAS

Obviamente que para una cuantificación segura de las provitaminas es necesario que haya primero una identificación conclusiva. Para los carotenoides ya

conocidos, la identificación conclusiva puede darse mediante la combinación consciente de parámetros tradicionales como el comportamiento cromatográfico, espectro de absorción y reacciones químicas específicas. Los datos cromatográficos (orden de elución en OCC, tiempos de retención en HPLC valor de R_f y co-cromatografía por TLC) proporcionan las primeras indicaciones sobre la identidad, pero no deberían ser usados como único criterio. El espectro visible permanece como el medio de diagnóstico más accesible al investigador. Su valor se fundamenta en la interacción de la luz con la cadena polienica conjugada y otras características estructurales (7). El tipo, localización y número de grupos funcionales en las xantofilas puede ser confirmado con las reacciones específicas para los grupos (3).

Los carotenos α-, β-, γ-caroteno y β-zeacaroteno, poseedores de actividad provitamínica A, los inactivos ζ- y δ-caroteno y el licopeno pueden ser distinguidos por sus espectros de absorción visible (Tabla 1). El espectro de β-criptoxantina es similar al del β-caroteno y los de α-criptoxantina y zeinoxantina son parecidos al del α-caroteno. Los hidroxicarotenoides, sin embargo, por ser mas polares, se absorben mas fuertemente a la columna de fase normal y a la capa fina de sílica, y además, la presencia del grupo hidroxilo puede ser confirmada por acetilación con anhídrido acético. Es claro que esta reacción no diferenciaría entre los dos monohidroxiderivados del α-caroteno (Figura 1) que exhiben espectro idéntico y comportamiento cromatográfico similar. Si bien estos pueden ser distinguidos por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa, la respuesta a la metilación con metanol acidificado es clara y simple: la zeinoxantina, que es inactiva, responde negativamente y la provitamina α-criptoxantina de forma positiva, debido a la posición alílica del grupo hidroxilo. Ya es sabido que la α-criptoxantina se encuentra mas ampliamente distribuida que la β-criptoxantina (71) a pesar de no ser un pigmento principal y su contribución al valor de vitamina A sea frecuentemente considerada insignificante. La zeinoxantina también es un pigmento común, y suele estar en mayor concentración, lo que puede inducir a un error si es confundida con la α-criptoxantina. En la fruta brasileña *Spondias lútea*, por ejemplo, esa superestimación podría llegar hasta 19% (31).

La localización del epóxido en la β-criptoxantina monoepóxido determina si el carotenoide tiene actividad o no. El espectro visible y la reacción del epóxido (Tabla 1) demuestra únicamente si el grupo es 5,6 ó 5',6'. Por resonancia magnética y espectrometría de masa fue establecido que, en la papaya, la posición de la función es 5,6 y por lo tanto tiene actividad provitamínica (72).

Aún con un método químico correcto a su disposición, el químico analítico debe enfrentar dos problemas más 1) la variación natural entre lotes diferentes del mismo alimento

y 2) los factores de conversión para transformar el contenido de provitamina en valor vitamínico o actividad vitamínica A.

Está demostrado que la composición de carotenoides varía en función de factores tales como el tipo de cultivar, estado de maduración, composición del suelo, clima, parte de la planta utilizada, duración de la poscosecha, condiciones de almacenamiento, etc., haciendo que el muestreo sea de fundamental importancia para un resultado confiable. Datos obtenidos de muestras de lote único, por tanto, son de dudosa validez y en nuestra opinión, informaciones adicionales sobre variedad o cultivar, estado de maduración, parte analizada, etc, deben complementar los resultados.

Pequeñas inexactitudes en el método analítico son despreciables en relación a errores grandes introducidos al efectuar la conversión de provitamina para actividad de vitamina A. Los valores son comúnmente expresados como equivalentes de retinol (ER) o unidades internacionales (UI) por 100 g, el primero siendo preferido. Por definición, 1 ER

es igual a 1 μg de retinol, ó 6 μg de β -caroteno, o 12 μg de otros carotenoides activos. La unidad internacional, por su lado, es una décima parte del ER, de forma que 1 UI es igual a 0,6 μg de β -caroteno (73). Estas equivalencias adoptadas por recomendación de un Comité de Peritos de la FAO/WHO, presuponen que apenas, 1/3 del β -caroteno es absorbido en el intestino y que, además, existe una eficiencia de conversión posterior de 50%. De esa forma, la biodisponibilidad total del caroteno resulta igual a 1/6, de la del retinol. Simpson y Tsou (74) consideraron que los factores de la NRC-NAS pueden ser demasiado conservadores, mientras que Bauernfeind et al. (75) afirmaron que una relación más realista debería ser de 2 μg , y no 0,6 μg de β -caroteno para 1 U.I.

Dejando de lado esos puntos de vista conflictivos, debe ser observado que el uso de un único factor de conversión para caroteno en toda una gama de fuentes alimenticias es una supersimplificación. Siendo imposible obtener un factor para cada alimento en separado, probablemente se

TABLA 1
ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS PROVITAMINAS COMUNES Y
CAROTENOIDES INACTIVOS QUE INTERFIEREN EN EL ANALISIS

Carotenoide	Provitamina A actividad (%)	λ max (n) en éter de petróleo	Ensayos químicos
β -caroteno	100	(425), 448, 475	-----
α -caroteno	50-54	422, 444, 473	-----
ζ -caroteno	inactivo	378, 400, 425	-----
β -zeacaroteno	20-40	406, 428, 454	-----
δ -caroteno	inactivo	431, 456, 489	-----
γ -caroteno	42-50	437, 462, 494	-----
licopeno	inactivo	446, 472, 505	-----
5,6-monoepoxi- β -caroteno	21	(423), 444, 473	epóxido +, desplazamiento de 20 nm al adicionar HCl diluído
mutatocromo	50	409, 428, 452	epóxido +
α -criptoxantina	activa (sin datos)	422, 444, 473	acetilación + metilación +
zeinoxantina	inactiva	422, 444, 473	acetilación + metilación
β -criptoxantina	50-60	(425), 449, 476	acetilación + metilación
5,6--monoepoxi- β -criptoxantina	activa (sin datos)	(422), 444, 473	acetilación + metilación -, desplazamiento de 20 nm al adicionar HCl diluído

Los números en paréntesis representan un "hombro"; epóxido + significa que el color naranja se torna azul o verde azulado cuando la placa de TLC se expone a los vapores de HCl.

deben establecer factores para grupos de alimentos, tales como verduras crudas, verduras cocidas, frutos de palmas, etc.

Hasta que esos factores no sean mejor definidos, los resultados de los análisis deben continuar siendo referidos en términos de contenido de provitamina A por unidad de peso, paralelamente con el valor vitamínico A aproximado para poder más tarde efectuar cálculos actualizados.

Por todo lo expuesto, gran parte de la inexactitud de los datos hoy día existentes, es debida no a las técnicas analíticas en sí, sino a la aplicación inadecuada de las mismas y a la interpretación errónea de resultados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la FAPESP y el CNPq por el apoyo financiero, sin el cual no hubiera sido posible la experiencia propia de este campo tan competitivo.

REFERENCIAS

- Rodriguez-Amaya, DB. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J Micronutrient Anal*, 5: 191-225, 1989
- International vitamin A Consultative Group. Minutes of the 12th Meeting of IVA CG. Addis Abeba, 7-12 diciembre Washington, D.C., The Nutrition Foundation. 1987.
- Liaaen-Jensen, S. In: Carotenoids, O Isler (Ed.). Basel, Switzerland, Berkhauser Verlag, p. 61-188. 1971
- Taylor, RF Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv Chromatogr*, 22: 157-213, 1983.
- Rodriguez-Amaya, DD, Kimura, M, Bodoy, HT Arima, HK Assessment of provitamin determination by open column chromatography visible absorption spectrophotometry. *J Chromatogr Sci*, 26: 624-629, 1988.
- Edwards, CG & Lee, CY. Measurement of provitamin carotenoids in fresh and canned carrots and green peas. *J Food Sci*, 1: 534535, 1986.
- Davies, BH Carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2nd ed, Vol. 2, T.W. Boodwin (Ed.) .London, Academic Press, p. 38-65. 1976
- Khacik, F, Beecher, GR. & Whitaker, NF Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetable by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem*, 34: 603-661, 1986.
- Bushway, RJ Wilson, AM. Determination of α and β carotene in fruit and vegetable by high performance liquid chromatograph. *Can Inst Food Sci Technol. J*, 15: 165-699, 1982.
- Baranyai, M, Matus, Z & Szabolcs, J. Determination, by HPLC, of carotenids in paprika products. *Acta Alimentaria*, 11: 309-323, 1982.
- Kimura, M, Rodriguez-Amaya, DB & Godoy, HT. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A *Food Chem.*, 3S: 187-195, 1990.
- Schmidt, K, Francis, G & Liaaen-Jensen, S Bacterial carotenoid XXXVI. Remarkable C₄₃ carotenoid artifacts of crossconjugated carotenals and new carotenoid glucosides from Athiorhodaceae spp. *Acta Chem Scand*, 25: 2476-2486 1971.
- Stewart, I. & Wheaton, TA. Conversion of β citraurin to reticulaxanthin and β apo-8-carotenal citranaxanthin during the isolation of carotenoids from citrus. *Phytochem*, 12: 2947-2951, 1973.
- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14th ed. Arlington, VA, p. 834-835. 1984.
- Simpson, KL Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc Nutr Soc*, 42: 7-17, 1983.
- Brubacher, G, Muller Mulot, W & Southgate, DT. Methods for the determination of vitamins in food. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1985, p. 33-50.
- Strain HH, Sherma, J & Grandolfo, M. Alteration of chloroplast pigment by chromatography with siliceous adsorbents. *Anal. Chem.*, 39: 926-932, 1967.
- Rodriguez, DB, Tanaka, Y, Kataama, T, Simpson, KL, Lee, TC & Chichester, CO. Hydroxlation of β carotene on microcel C. *J Food Agric Chem*, 24: 819-822, 1976a.
- Tanaka, Y, Katayama, T, Simpson, KL, & Chichester, CO. Stability of carotenoids on silica gel and other adsorbents. *Bull Jap Soc Fish*, 46: 799, 1981.
- Rouchaud, J, Moons, C. & Meer, J. Effects of pesticide treatments on the carotenoid pigments of lettuce. *J Agric Food Chm*, 32: 1241-1245, 1984.
- Rodriguez, DB, Raymundo, LC, Lee, TO, Simpson, KL Chichester, CO. Carotenoid pigment change in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.*, 40: 615-624, 1976b.
- Cecchi, HM & Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anarcadium occidentale L.*) Juice. *J Food Sci*, 46: 147-149, 1981a.
- Cecchi, HM & Rodriguez-Amaya, DB. Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. *Cienc Cultura*, 33: 72-76, 1981b.
- Padula, M, Rodriguez-Amaya, DB & Moraes, MA. Comparison of the carotenoid composition and general properties of the processed juice of guava IAC-4 and commercial juices. *Cienc Tecnol Aliment*, 3:109-116, 1983.
- Rodriguez-Amaya, DB, Bobbio, PA & Bobbio, FO. Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit, *Cyphomandra betacea*. *Food Chem*, 12: 61-65, 1983.
- Padula, M & Rodriguez-Amaya, DB Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guava (*Psidium guajava L.*) . *Food Chem*, 20:11-19, 1986.
- Ramos, DMR, Rodriguez-Amaya DB. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. *J. Micronutr Anal.*, 3: 147-155, 1987.
- Kimura, M & Rodriguez-Amaya, B. Cultivar differences, geographic effects and influence of exogenous ethylene on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. Presentado em: 8th International Symposium on Carotenoids, Boston, 1987.

29. Arima, HK, Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. *J Micronutr Anal*, 4: 177-191, 1988.
30. Godoy, HT & Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoid composition of commercial mangoes from Brazil. *Lebensm. Wiss Technol*, 22: 100-103, 1989.
31. Rodriguez-Amaya, DB & Kimura, M. Composição de carotenóides e valor de vitamina A em Cajá (*Spondias lutea*). *Cienc Tecnol Aliment*, 9: 148-162, 1989.
32. Mercadante, Z & Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leaf vegetables. *Int. J Food Sci Technol*, 5: 213-819, 1990.
33. Tavares, C & Rodriguez-Amaya, DB. Determinação de provitaminas A e carotenóides em alimentos "in natura" e processados. Apresentado em: IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Belo Horizonte, outubro de 1988.
34. Arima, HK & Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and pumpkin from Northeastern Brasil. *Arch Latinoamer Nutr*, (em prensa).
35. Trujillo-Quijano, JA, Rodriguez-Amaya, DB, Esteves, W & Plonis, GF. Carotenoid composition and vitamin A value of oils from four Brazilian palm fruits. *Fat Sci Technol*, 136 (em prensa) 1990.
36. Padula, M & Rodriguez-Amaya, DB. Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. *Acta Alimentaria*, 16: 209-216, 1987.
37. Godoy, HT & Rodriguez-Amaya, DB. Changes in individual carotenoids on Processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. *Int. J Food Sci Technol*, 22: 451-460, 1987.
38. Penteado, MVC, Minazzi, RS & Almeida, LB. Carotenóides e atividade pro-vitáminica A em folhas de hortaliças consumidas no norte do Brasil. *Rev Farm Bioquim Univ S Paulo*, 22: 97-102, 1986.
39. Almeida, LB & Penteado, MVC. Carotenóides e valor de pró-vitáminico A da mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza Bancr*) consumida em Sao Paulo. *Rev Farm Bioquim Univ S Paulo*, 23: 52-57, 1987a
40. Almeida, LB, Penteado, MVC. Carotenóides com atividade pró-vitáminica de cenouras (*Daucus carota L.*) comercializadas em Sao Paulo. *Rev Farm Bioquim. Univ S. Paulo*, 23: 133-141, 1987b.
41. Almeida, LB & Penteado, MVC. Carotenoids and provitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). *J Food Comp Anal.*, 1: 341-352, 1988.
42. Hiane, PA & Penteado, MVC. Carotenóides e valores de vitamina A do fruto e da farinha de bacaiúva (*Acrocomia mokayaba* Barb. Rodr.) do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Farm Bioquim Univ. S. Paulo*, 25: 158-168, 1989.
43. Bickoff, EM, Atkins, ME, Bailey, G.F. & Stitt, F. Stereoisomeric analysis of β carotene. *J Assoc. Off Anal. Chem*, 32: 77-74, 1949.
44. Sweeney, JP & Marsh, AC. Separation of carotene stereoisomers in vegetables. *J Assoc. Off Anal. Chem.*, 53: 937-940, 1970.
45. Sweeney, JP & Marsh, AC. Effect of processing on provitamin A in vegetables. *J Am Diet Assoc*, 59: 238-243, 1971.
46. Tsai, SW, Tsou, SCS & Simpson, KL. Reversed phase flash column analysis of provitamin A carotenoids. *J Micronutrient Anal*, 5: 171-179, 1989.
47. Mercadante, AZ & Rodriguez-Amaya, DB. Comparison of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. *Chromatographia*, 28: 242-252, 1989.
48. Simpson, KL, Tsou, SCS & Chichester, CO. Carotenes. In *Methods of Vitamin Assay*, 4th ed. J. Augustin, BP Klein, DA Becker & PB Venugopal (Eds.). New York, John Wiley 1985, p. 185-220.
49. Zakaria, M Simpson, KL, Brown, PR & Krstulovic, A. Use of reversed-phase, high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J Chromator*, 176: 101-117, 1979.
50. Hsieh, YPC & Karel, M. Rapid extraction and determination of α and β carotene in foods. *J Chromatogr*, 259: 515-518, 1983.
51. Bushway, RJ. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr*, 8: 1527-1547, 1985.
52. Bushway, RJ. Determination of alpha and beta carotene in some raw fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, 34: 409-412, 1986.
53. Bushway, RJ, Yang, A. & Yamani, AM. Comparison of α and β carotene content of supermarket versus roadside stand produce. *J Food Qual* 9: 437-443, 1986.
54. Bureau, JL & Bushway, RJ. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J Food Sci*, 51: 128-130, 1986.
55. Quackenbush, FW & Smallidge, RL. Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantitation of provitamins A. *J Assoc Off Anal Chem*, 69: 767-772, 1986.
56. Speek, AJ, Temalilwa, CR & Shrijver, J. Determination of β carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Food Chem*, 19: 65-74, 1986.
57. Speek, AJ, Speek-Saichua, S & Shreurs, WHP. Total carotenoid and β carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. *Food Chem.*, 27: 245-257, 1988.
58. Pepping, F, Vencken, CMJ & West, CE. Retinol and carotene content of foods consumed in East Africa determined by high performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric*, 45: 359-371, 1988
59. Vecchi, M, Englert G, Maurer R & Meduna V. Trennung und charakterisierung von β carotin-isomeren. *Helv Chim Acta*, 64: 2746-2758, 1981.
60. Stewart I. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J Assoc Off Anal. Chem*, 60: 132-136, 1977a.
61. Stewart I. Provitamin A and carotenoid content of citrus juice. *J Agric Food Chem*, 25: 1132-1137, 1977b.
62. Brauman, T & Grimme, LH. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochim Biophys Acta.*, 637: 8-17, 1981.

63. Nelis, HJCF. & De Leenheer, AP. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal Chem*, 55: 270-275, 1983.
64. Khacik, F & Beecher, BR. Decapreno β - carotene as an internal standard for the quantification of the hidrocarbon carotenoids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.*, 346: 237-246, 1985.
65. Thompson, JN. Problem of official methods and new techniques for analisis of foods and feeds for vitamin A. *J Assoc Off Anal. Chem.*, 69: 727-738, 1986.
66. Ruedi, P. HPLC: A powerful tool in carotenoid research. *Pure Appl Chem*, 57: 793-800, 1985.
67. Quackenbush, FW. Reverse phase HPLC separation of cis and trans-carotenoids and its application to β carotenes in food materials. *J Liq Chromatogr*, 10: 643-653, 1987
68. Tsukida, K, Saiki, K, Takii, T. & Koyama, Y. Separation and determination of cistrans- β -carotenes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 245: 359-364, 1982.
69. Chandler, LA & Schwartz, SJ HPLC separation o cis-trans isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J Food Sci*, 52: 66-72, 1987.
70. Carvalho, PRN, Collins, CH & Rodriguez-Amaya, DB Provitamin A determination by open column chromatography and HPLC. Presentado em: 9th International Symposium on Carotenoids. Kyoto, mayo de 1990.
71. Rodriguez-Amaya, DB, Cecchi, HM, Padula, M, Godoy, HT, Ramos, DM, Kimura, M & Tavares, C.A. Distribution of carotenoids in Brazilian foods. Presentado em: 8th International Symposium on Carotenoids. Boston, julio de 1987.
72. Godoy, HT, Rodriguez-Amaya, DB, Connor, AE & Britton, G. Confirmation of the structure of papaya β -cryptoxanthin monoepoxide. *Food Chem*, 36: 281-286, 1990.
73. National Research Council. Recommended Dietary Allowances, 9th ed, Washington, D.C., NRC-NAS, 1980, p. 55-71
74. Simpson, KL & Tsou, SCS. Vitamin A and provitamin composition of foods. In: Vitamin A Deficiency and its Control. JC Bauernfeind (Ed.). New York, Academic Press, 1986, p. 461- 478.
75. Bauernfeind, JC, Adams, CR & Marusich, WL. Carotenes and other vitamin A precursors in animal feed. In: Carotenoids as Colorant and Vitamin A Precursors. JC Bauernfeind (Ed.). New York, Academic Press, 1981, p. 563-743.