

Vantagens e desvantagens das colunas C_{18} e C_{30} para a separação de carotenóides por CLAE

Itaciara Larroza Nunes, Adriana Zerlotti Mercadante*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Estudos têm demonstrado uma alta associação entre ingestão ou nível plasmático de carotenóides e a diminuição do risco ou proteção contra algumas doenças. Estes fatos, bem como a elevada suscetibilidade destes compostos à luz e calor, com formação de isômeros cis, os quais apresentam menor atividade biológica, torna importante o desenvolvimento de sistemas que permitam a separação destes carotenóides em alimentos. Neste trabalho foi avaliada a separação de isômeros geométricos de licopeno, e dos isômeros de posição luteína e zeaxantina, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando colunas C_{18} (monomérica, 4 mm, 300 x 3,9 mm) e C_{30} (polimérica, 3 mm, 250 x 4,6 mm) e diferentes fases móveis, tanto com eluição isocrática como com gradiente. Os carotenóides foram identificados através das características espectrais e co-cromatografia com padrões. As melhores condições cromatográficas foram obtidas em coluna C_{30} com temperatura de 33 °C, eluição isocrática a 1 mL/min e fase móvel com metanol (0,1% trietilamina)/éter metil-terc-butílico (50:50) para separar isômeros de licopeno e (95:5) para luteína e zeaxantina. Entretanto, para análise quantitativa, é necessário verificar a repetibilidade da área dos picos na coluna C_{30} . Além disso, a coluna C_{18} monomérica pode ser empregada para separar luteína e zeaxantina.

Unitermos

- Licopeno
- Luteína
- Zeaxantina
- CLAE
- Coluna C_{30}
- Coluna C_{18}
- Isômeros

*Correspondência:

A. Z. Mercadante
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos
UNICAMP - Cx. Postal 6121
CEP 13083-862
Campinas - SP - Brasil
E-mail: azm@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o licopeno vem ganhando destaque devido ao seu elevado potencial antioxidante e associação ao menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata (Van den Berg *et al.*, 2000; Giovannucci, 2002; Venkateswaran *et al.*, 2004). Estudos têm de-

monstrado que o elevado consumo de luteína e zeaxantina está relacionado à significativa redução da catarata e da degeneração macular (Junghans *et al.*, 2001; Stringham, Hammond, 2005).

Colunas de fase reversa C_{18} e C_{30} vêm sendo amplamente utilizadas para separação de carotenóides. Em geral, melhores separações de carotenos e isômeros têm

sido demonstradas com C_{18} poliméricas do que com monoméricas (Sander *et al.*, 2000). Em coluna C_{18} monomérica não houve boa separação de isômeros geométricos (ou *cis-trans*) de carotenóides apolares e entre luteína e zeaxantina (Sander *et al.*, 1994). Por outro lado, a vantagem da coluna C_{30} (polimérica) em relação à coluna C_{18} é a possibilidade de separar maior número de isômeros, além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenóides não-simétricos, como 13-*cis*-, 13'-*cis*-, 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína (Emenhiser *et al.*, 1996).

Utilizando coluna C_{30} e eluição isocrática de metanol (MeOH)/éter metil-*terc*-butílico (TBME) (50:50) como fase móvel, foram separados *trans*- e 5-*cis*-licopeno em tecidos humanos (Fang *et al.*, 2002), enquanto que foram separados o *trans*-licopeno e mais 4 isômeros *cis* em pasta de tomate (Böhm *et al.*, 2002).

Gradiente linear e fases móveis contendo misturas de MeOH/TBME/ H_2O para separar *trans*- e *cis*-licopeno em coluna C_{30} foram utilizados em diversos estudos. Com estas condições, foram separados *trans*- e 5-*cis*-licopeno e outros 4 isômeros *cis* de licopeno em dieta, tecidos e soro de ratos (Boileau *et al.*, 2000, 2001), *trans*- e 4 isômeros *cis* de licopeno em padrão isomerizado (Böhm, 2001), enquanto Re *et al.* (2001) reportaram a separação de *trans*-, 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis*-licopeno em padrão e purê de tomate incubado em suco gástrico humano. Em tomate variedade tangerina, foram separados *trans*- e 11 isômeros *cis* de licopeno (Ferruzzi *et al.*, 2001) e Hackett *et al.* (2004) demonstraram a separação de *trans*-, 5-*cis*-licopeno e 7 isômeros *cis* de licopeno em padrão isomerizado e oleoresinas de tomate. Cabe destacar que a maioria dos isômeros *cis* não foi identificada nestes trabalhos.

Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de luteína e zeaxantina em alimentos, utilizando condições cromatográficas semelhantes às citadas para licopeno, tem sido utilizada por diversos autores. Coluna C_{30} e fases móveis contendo diferentes concentrações de MeOH/TBME/ H_2O em sistema de gradiente foram utilizadas para separação desses carotenóides em amostras de milho (Moros *et al.*, 2002), trigo (Hentschel *et al.*, 2002) e batata branca e amarela (Breithaupt, Bamedi, 2002), sendo que em todos os casos foi relatada boa separação dos picos de luteína e zeaxantina na linha de base.

Apesar do maior uso da coluna C_{30} para separar carotenóides, a separação de luteína, zeaxantina e seus isômeros geométricos também foi realizada em colunas de fase normal. Humphries, Khachik (2003) empregaram coluna ciano para avaliar a distribuição de isômeros de luteína (all-*trans*-, 13,13'-*dicis*-, 9-*cis*- e 9'-*cis*-luteína) e de zeaxantina (all-*trans*-, 9-*cis*- e 13-*cis*-zeaxantina) em frutas, vegetais, trigo e massas. Panfili *et al.* (2004) usa-

ram coluna de sílica para separação de all-*trans*-luteína e dos seus isômeros 13,13'-*dicis*-, 9-*cis*- e 9'-*cis*- em cereais. Mendes-Pinto *et al.* (2004) compararam coluna de fase reversa polimérica C_{18} e de fase normal ciano para separar carotenóides em uvas, obtendo separação dos picos de luteína e zeaxantina somente quando utilizada fase normal.

Devido à presença de um grande número de ligações duplas conjugadas na estrutura, os carotenóides são suscetíveis a alterações químicas quando expostos à luz e calor, formando isômeros *cis*, que possuem menor atividade biológica. Desta forma, é importante desenvolver sistemas que permitam a separação destes carotenóides em alimentos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a separação de isômeros geométricos de licopeno e dos isômeros de posição luteína e zeaxantina por CLAE, utilizando colunas C_{18} e C_{30} .

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Foram utilizados padrões de all-*trans*-licopeno, 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*-licopeno, luteína e zeaxantina provenientes da DSM Nutritional Products (Suíça) e cristal de all-*trans*-licopeno obtido a partir de tomate fresco (Nunes, Mercadante, 2004).

Os reagentes utilizados para obtenção de licopeno foram de grau p.a., enquanto que para análise cromatográfica todos os solventes foram de grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μm . Imediatamente antes da análise por CLAE, os padrões foram solubilizados e filtrados em membrana de polietileno com 0,22 μm de poro.

Preparação e isomerização do licopeno

Cristais de licopeno foram obtidos de tomate fresco de acordo com Nunes, Mercadante (2004). A metodologia consistiu de (1) etapa preliminar para remoção de água com quatro extrações de 30 minutos, cada uma com 30 mL de etanol comercial e posterior descarte do solvente, (2) quatro extrações de 120 minutos com acetato de etila, cada extração com razão massa/solvente de 10:7, (3) eliminação do solvente em evaporador rotatório e (4) duas cristalizações com diclorometano/etanol (1:4).

Para promover a isomerização, os cristais foram dissolvidos em diclorometano/metanol (2:8) e aquecidos no escuro em banho-maria a 90 ± 5 °C durante 2 horas.

Análise por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 996), sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo 600), injetor Rheodyne com válvula de injeção de 20 µL, forno externo com controle de temperatura, degaseificador “on line” e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados no comprimento de onda máximo.

Para a separação de isômeros de licopeno, foram testadas as condições cromatográficas descritas na Tabela I em coluna C₃₀ polimérica da marca YMC (3 µm, 250 x 4,6 mm), sempre com vazão de 1 mL/min. As condições de fases móveis avaliadas em coluna C₁₈ monomérica Nova-Pak (4 µm, 300 x 3,9 mm), mantida a 29 °C e vazão de 1 mL/min, sempre utilizando MeOH/EtOAc (50:50) como solvente de injeção, estão apresentadas na Tabela II.

Para separação de luteína e zeaxantina em coluna C₃₀ foram testadas fases móveis com eluição isocrática contendo MeOH/TBME (50:50 ou 95:5) e temperatura da coluna

TABELA I - Condições testadas com coluna C₃₀ em CLAE para separação de isômeros de licopeno

| Fase Móvel ^a | Temperatura (°C) | Solvente de injeção | Tempo de corrida (min) ^b |
|---|------------------|---------------------|-------------------------------------|
| MeOH/TBME (62:38) | 29 | EtOAc | 70 |
| MeOH/TBME/DCM (52:38:10) | 29 | EtOAc | 40 |
| MeOH/TBME (50:50) | 29 e 33 | EtOAc | 35 |
| | | MeOH/TBME (50:50) | 33 |
| MeOH/TBME/DCM (50:25:25) | 29 | EtOAc | 30 |
| | | MeOH/TBME (50:50) | 29 |
| gradiente linear de MeOH/TBME 90:10 para 55:45 em 35 min, para 40:60 em 10 min | 29 | MeOH/TBME (50:50) | 56 |
| gradiente linear de MeOH/TBME de 60:40 para 50:50 em 15 min | 29 | MeOH/TBME (50:50) | 42 |
| gradiente linear de MeOH/TBME de 80:20 para 50:50 em 20 min | 29 | MeOH/TBME (50:50) | 50 |
| MeOH/TBME 50:50 isocrático de 0 a 20 min, gradiente linear para 20:80 em 1 min | 29 | MeOH/TBME (50:50) | 30 |
| gradiente linear de MeOH/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 min | 29 e 33 | MeOH/TBME (50:50) | 40 e 38 |

^aVazão de 1 mL/min; ^bTempo de eluição do all-*trans*-licopeno com 5 minutos adicionais; MeOH: metanol contendo 0,1% trietilamina (TEA), TBME: éter metil-*terc*-butílico, EtOAc: acetato de etila.

TABELA II - Condições testadas com coluna C₁₈ em CLAE para separação de isômeros de licopeno

| Fase Móvel ^a | Tempo de corrida (min) ^b |
|--|-------------------------------------|
| ACN/MeOH/EtOAc (75:15:10) | 21 |
| MeOH/EtOAc (90:10) | 24 |
| MeOH/EtOAc/H ₂ O (70:25:5) | 43 |
| MeOH/THF/H ₂ O (70:25:5) | 25 |
| MeOH/DCM/H ₂ O (70:25:5) | 28 |
| MeOH/DCM/H ₂ O (55:35:10) | 28 |
| Gradiente linear de MeOH/EtOAc/H ₂ O de 85:5:10 para 70:30:0 em 15 min | 29 |
| Gradiente linear de MeOH/DCM/H ₂ O de 85:5:10 para 70:30:0 em 15 min | 27 |
| Gradiente linear de MeOH/EtOAc/H ₂ O de 80:10:10 para 70:30:0 em 20 min | 33 |

^aVazão de 1 mL/min, coluna mantida a 29 °C e MeOH/EtOAc (50:50) como solvente de injeção; ^bTempo de eluição do all-*trans*-licopeno com 5 minutos adicionais; ACN: acetonitrila, MeOH: metanol com 0,1% de trietilamina, EtOAc: acetato de etila, THF: tetraidrofurano, DCM: diclorometano, H₂O: água.

de 33 °C. Em coluna C_{18} foram avaliadas fases móveis com eluição isocrática contendo misturas de ACN/EtOAc/ H_2O (88:6:6, 88:8:4, 88:10:2 ou 92:2:6) e gradiente linear de ACN/EtOAc/ H_2O de 88:2:10 para 85:15:0 em 20 minutos com temperatura da coluna mantida a 29 °C. Para as duas colunas, a vazão de todas as fases móveis foi de 1 mL/min, sempre utilizando MeOH como solvente de injeção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isômeros de licopeno

Os padrões de isômeros 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno utilizados neste trabalho apresentaram λ_{max} e forma do espectro similares aos previamente relatados na literatura (Hengartner *et al.*, 1992; Schierle *et al.*, 1997; Mercadante *et al.*, 1999; Nunes, Mercadante, 2004), como mostra a Figura 1. Como a ligação dupla na posição 5 não está em conjugação com a cadeia poliênica, o espectro do 5-*cis*-licopeno é idêntico ao do all-*trans*-, enquanto que os espectros dos demais isômeros *cis* apresentaram deslocamento hipsocrômico de 6 a 7 nm. Além disso, verifica-se que a intensidade do pico *cis* (a 359 nm) vai aumentando à medida que a isomeria está localizada mais ao centro da cadeia, como nos espectros do 9-*cis*- e 13-*cis*-licopeno.

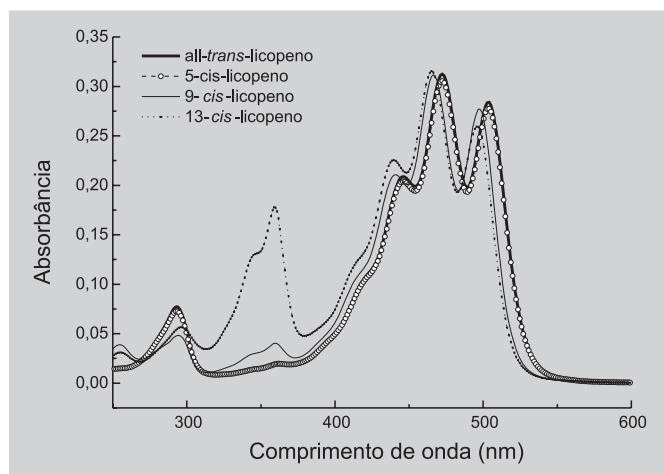


FIGURA 1 - Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e all-*trans*-licopeno.

Dentre as fases móveis testadas em coluna C_{30} , as que promoveram a melhor separação dos isômeros de licopeno do padrão termicamente isomerizado e dos padrões da DSM foram: MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50) em modo isocrático e gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 minutos, ambas com vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna de 33 °C e utilizando como solvente de injeção MeOH/TBME (50:50).

Optou-se por trabalhar com a fase móvel no modo isocrático devido às dificuldades encontradas no acondicionamento da coluna com a utilização de gradiente. Mesmo após 30 minutos de acondicionamento, a repetibilidade da área do pico do all-*trans*-licopeno foi baixa (desvio-padrão relativo (%RSD) de 5,0 para 8 injeções seguidas) e o número de picos minoritários separados foi diferente em cada corrida, o que pode ser constatado na Figura 2.

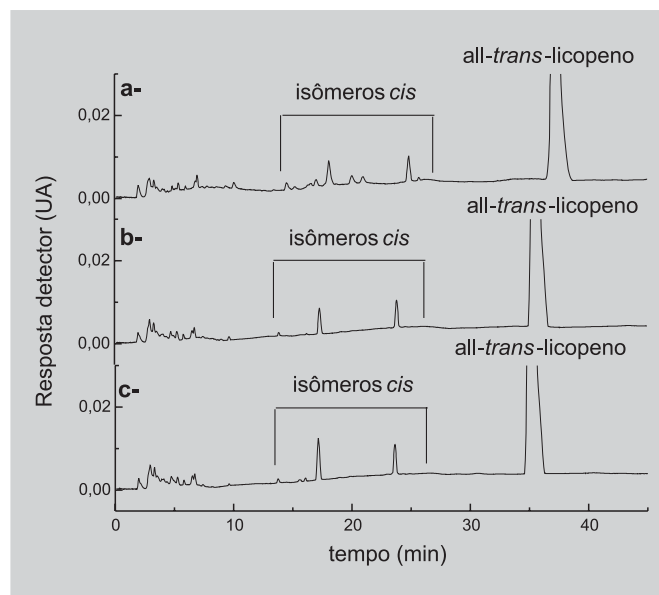


FIGURA 2 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, de licopeno isomerizado, a-1ª injeção, b-injeção após 20 min de acondicionamento, c-injeção após 30 min de acondicionamento. Condições cromatográficas: coluna C_{30} , gradiente linear MeOH (0,1% TEA)/TBME de 60:40 para 50:50 em 20 minutos, vazão de 1 mL/min, temperatura da coluna de 33 °C e solvente de injeção MeOH/TBME (50:50).

A utilização de gradiente em coluna C_{30} para separação de isômeros de licopeno em diversas matrizes tem sido utilizada por muitos autores (Boileau *et al.*, 2000, 2001; Böhm, 2001; Re *et al.*, 2001; Ferruzzi *et al.*, 2001; Hackett *et al.*, 2004) sendo que em nenhum destes trabalhos foram mencionados problemas com o acondicionamento da coluna ou co-eluição de picos.

Mouly *et al.* (1999), ao estudarem a determinação da origem geográfica de suco de laranja da variedade valencia através do perfil cromatográfico de carotenóides obtido por CLAE em coluna C_{30} , utilizando como fase móvel gradiente linear de MeOH/TBME/ H_2O , observaram que após aproximadamente 100 injeções realizadas nesta coluna, os picos de isoluteína e zeaxantina passaram a co-eluir. Não foi citado o tempo de acondicionamento da coluna entre as injeções.

Quando utilizada fase móvel no modo isocrático, o valor do RSD de 3 injeções da área do pico do all-*trans*-

licopeno foi de 0,7% e o número de picos minoritários foi sempre o mesmo. Neste caso somente após, aproximadamente, 250 injeções passou a ocorrer falta de repetibilidade da área dos picos e dos tempos de retenção.

A Figura 3a apresenta a melhor condição cromatográfica para separação dos padrões de 13-*cis*-, 9-*cis*-, 5-*cis*- e *all-trans*-licopeno, utilizando a coluna C₃₀ em modo isocrático, sendo que a ordem de eluição dos picos foi a mesma da encontrada no gradiente empregado neste estudo e da reportada por Re *et al.* (2001), embora neste trabalho tenha sido utilizada fase móvel contendo H₂O, além de MeOH e TBME, e sistema de gradiente.

Embora não tenha ocorrido separação entre *all-trans*- e 5-*cis*-licopeno na linha de base em nenhuma das fases móveis e colunas testadas no presente trabalho, estes dois compostos foram melhor resolvidos quando utilizada coluna C₃₀, com o 5-*cis*- eluindo logo após o *all-trans*-licopeno. Este fato foi verificado também por Boileau *et al.* (2000, 2001) e Re *et al.* (2001), ambos utilizando coluna C₃₀ e fases móveis em sistema gradiente.

Utilizando a coluna C₁₈ (Figura 3b), o 9-*cis*-licopeno eluiu junto com o *all-trans*-licopeno, com separação parcial do 13-*cis*-licopeno em todas as condições avaliadas.

Luteína e zeaxantina

Os padrões de *all-trans*-luteína e *all-trans*-zeaxantina apresentaram λ_{\max} e forma do espectro similares aos previamente relatados na literatura (Britton, 1995; Zanatta, Mercadante, 2007) (Figura 4). A *all-trans*-zeaxantina apresenta uma ligação dupla conjugada (l.d.c) a mais na estrutura do que a *all-trans*-luteína e conseqüentemente um λ_{\max} com maior comprimento de onda (5 nm). Entretanto, o fato de esta l.d.c estar localizada no anel β explica a estrutura fina (%III/II) reduzida da mesma, quando comparada com a *all-trans*-luteína (Britton, 1995).

Como pode ser observado nas Figuras 5a e 5b, a melhor separação dos padrões de luteína e zeaxantina foi também obtida em coluna C₃₀. Resultados semelhantes foram apresentados por Sander *et al.* (1994) em estudo comparativo de fases estacionárias C₁₈ (monomérica e polimérica) e C₃₀ na separação de padrões de diversos carotenóides.

Zanatta, Mercadante (2007) obtiveram resoluções similares dos picos de luteína e zeaxantina em extrato de camu-camu utilizando as mesmas colunas C₁₈ monomérica (gradiente linear de ACN/H₂O/EtOAc, partindo de 88:10:2, atingindo 85:0:15 em 15 min, e 70:0:30 em 35 min, mantendo até o final) e C₃₀ polimérica (gradiente de H₂O/MeOH/TBME de 5:80:5 atingindo 0:95:5 em 12 min, 0:89:11 em 25 min, 0:75:25 em 40 min e 0:50:50 em 60 min) usadas no presente estudo.

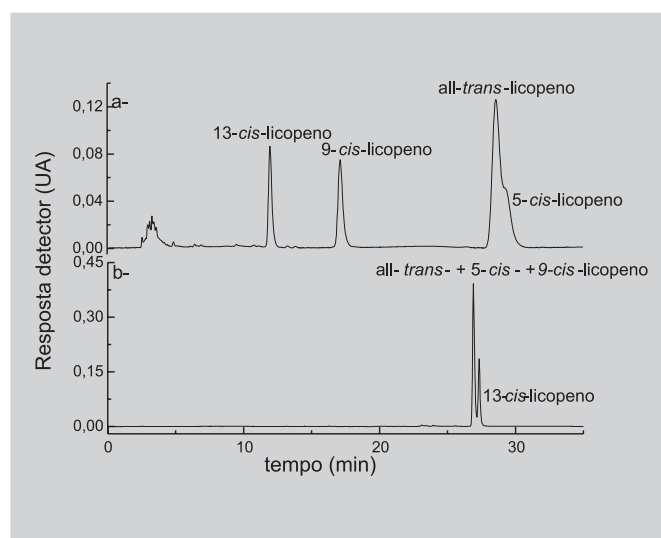


FIGURA 3 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*- e *all-trans*-licopeno. Condições **a**-coluna C₃₀ YMC, fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (50:50), 1 mL/min e temperatura da coluna de 33 °C, **b**-coluna C₁₈ Nova-Pak, fase móvel gradiente linear de MeOH (0,1% TEA)/EtOAc/H₂O de 80:10:10 para 70:30:0 em 20 min, 1 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C. Processamento em λ_{\max} .

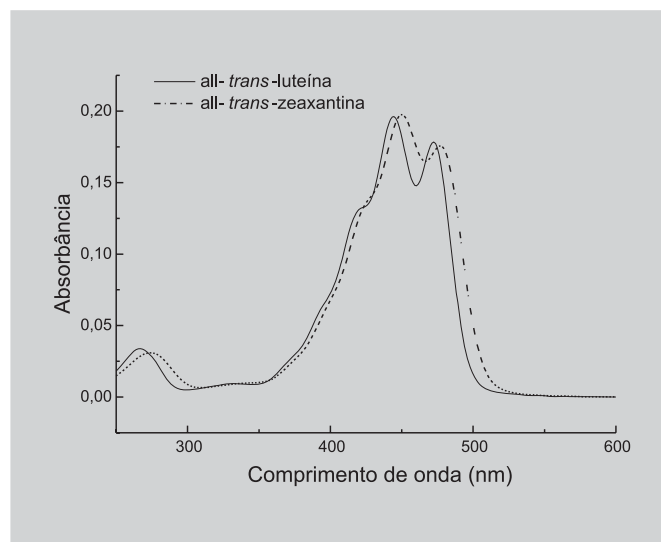


FIGURA 4 - Espectros, obtidos por CLAE-DAD em MeOH (0,1%TEA)/TBME (95:5), dos padrões de *all-trans*-luteína e *all-trans*-zeaxantina.

CONCLUSÃO

No presente trabalho a coluna C₃₀ polimérica mostrou maior poder de resolução tanto na separação dos isômeros 5-*cis*-, 9-*cis*- e 13-*cis*-licopeno quanto de luteína e zeaxantina. Pelo fato destes isômeros serem os mais encontrados em ali-

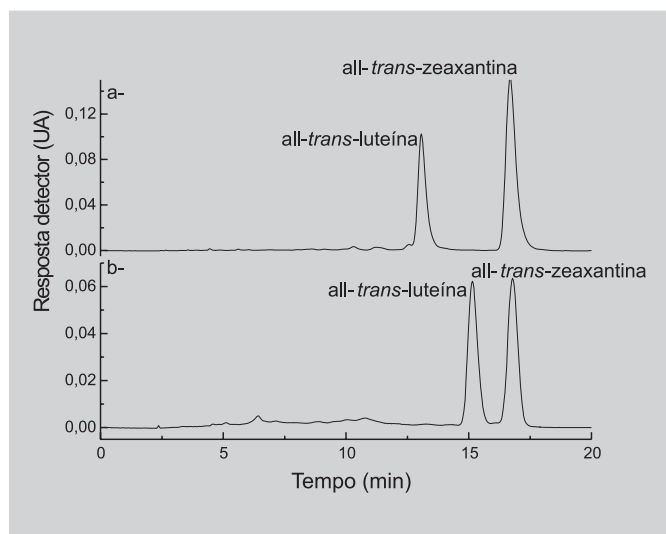


FIGURA 5 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, da mistura dos padrões de luteína e zeaxantina. Condições **a**- coluna C_{30} YMC, fase móvel MeOH (0,1% TEA)/TBME (95:5), 1 mL/min e temperatura da coluna de 33 °C, **b**- coluna C_{18} Nova-Pak, fase móvel ACN/EtOAc/H₂O (92:2:6), 1 mL/min e temperatura da coluna de 29 °C. Processamento em λ_{\max} .

mentos processados, o uso da coluna C_{30} é recomendado apesar do éter metil-*terc*-butílico, utilizado na fase móvel e da própria coluna apresentarem elevado custo no Brasil. Entretanto, caso o objetivo seja acompanhar as mudanças quantitativas é necessário verificar a ocorrência de problemas com a repetibilidade das áreas dos picos separados em coluna C_{30} . Além disso, a coluna C_{18} monomérica pode ser empregada quando o objetivo foi separar os isômeros de posição luteína e zeaxantina.

ABSTRACT

Advantages and disadvantages of C_{18} and C_{30} columns for HPLC separation of carotenoids

Several studies have demonstrated a high association between dietary intake or plasma levels of carotenoids and the decrease of risk or the protection against some diseases. Taking this into consideration, as well as the high susceptibility of these compounds to light and heat, leading to the formation of cis isomers with lower biological activity, it is important to develop systems that allow the separation of such compounds in foods. This work evaluated the separation of the geometric isomers of lycopene and of the position isomers, lutein and zeaxanthin, by high performance liquid chromatography (HPLC) using C_{18} (monomeric, 4 mm, 300 x 3.9 mm) and C_{30} (polymeric 3 mm, 250 x 4.6 mm) columns and many different mobile phases, with either

isocratic or gradient elution. The carotenoids were identified by their spectral characteristics and co-chromatography with standards. The best chromatographic conditions were achieved with the C_{30} column, temperature set at 33 °C and as mobile phase an isocratic elution of methanol (0.1% triethylamine)/tert-butyl methyl ether (50:50) to separate lycopene isomers and (95:5) for lutein and zeaxanthin, both at 1 mL/min. However, for quantitative analysis, it is necessary to evaluate the peak area repeatability on the C_{30} column. In addition, the monomeric C_{18} column can be employed for separation of lutein and zeaxanthin.

UNITERMS: Lycopene. Isomers. Lutein. Zeaxanthin.
HPLC. C_{30} column. C_{18} column.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa do primeiro autor e auxílio financeiro e a DSM Nutritional Products (Suíça) pela doação dos padrões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÖHM, V. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C_{30} high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, v.24, p.955-959, 2001.
- BÖHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N.L.; FERRUZZI, M.G.; SCHWARTZ, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.221-226, 2002.
- BOILEAU, A.C.; CLINTON, S.K.; ERDMAN JR., J.W. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J. Nutr.*, v.130, p.1613-1618, 2000.
- BOILEAU, A.C.; CLINTON, S.K.; ZARIPHEH, S.; MONACO, M.H.; DONOVAN, S.M.; ERDMAN JR., J.W. Testosterone and food restriction modulated hepatic lycopene isomer concentrations in male F344 rats. *J. Nutr.*, v.131, p.1746-1752, 2001.
- BREITHAUPT, D. E.; BAMEDI, A. Carotenoids and carotenoids esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L): new insights into an ancient vegetable. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.7175-7181, 2002.
- BRITTON, G. UV/visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H., eds. *Carotenoids: spectroscopy*. Basel: Birkhäuser, 1995. v. 1B, p.13-62.

- EMENHISER, C.; ENGLERT, G.; SANDER, L. C.; LUDWIG, B.; SCHWARTZ, S. J. Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene. *J. Chromatogr. A.*, v.719, p.333-343, 1996.
- FANG, L.; PAJKOVIC, N.; WANG, Y.; GU, C.; VAN BREEMEN, R. B. Quantitative analysis of lycopene isomers in human plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 75, p. 812-817, 2003.
- FERRUZZI, M. G.; NGUYEN, M. L.; SANDER, L. C.; ROCK, C. L.; SCHWARTZ, S. J. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Chromatogr. B.*, v.760, p.289-299, 2001.
- GIOVANNUCCI, E. Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature. *Pure Appl. Chem.*, v.74, p.1427-1434, 2002.
- HACKETT, M. M.; LEE, J. H.; FRANCIS, D.; SCHWARTZ, S. J. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. *J. Food. Sci.*, v.69, p.536-541, 2004.
- HENGARTNER, U.; BERNHARD, K.; MEYER, K.; ENGLERT, G.; GLINZ, E. Synthesis, isolation, and NMR-Spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and of some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta*, v.75, p.1849-1865, 1992.
- HENTSCHEL, V.; KRANI, K.; HOLLMANN, J.; LINDHAUER, M. G.; BÖHM, V.; BITSCH, R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.6663-6668, 2002.
- HUMPHRIES, J. M.; KHACHIK, F. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.1322-1327, 2003.
- JUNGHANS, A.; SIES, H.; STAHL, W. Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.391, p.160-164, 2001.
- MENDES-PINTO, M. M.; FERREIRA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PINHO, P. G. Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed and normal phase liquid chromatography: a qualitative analysis. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.3182-3188, 2004.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, v.47, p.145-141, 1999.
- MOROS, E. E.; DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E. G.; JERREL, J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.5787-5790, 2002.
- MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; CORSETTI, J. Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. *J. Chromatogr. A.*, v.844, p.149-159, 1999.
- NUNES, I.; MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.24, p.440-447, 2004.
- PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.6373-6377, 2004.
- RE, R.; FRASER, P. D.; LONG, M.; BRAMLEY, P. M.; RICE-EVANS, C. Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.281, p.576-581, 2001.
- SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; CRAFT, N. E.; WISE, S. A. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal. Chem.*, v.66, p.1667-1674, 1994.
- SANDER, L. C.; SHARPLESS, K. E.; PURSCH, M. C₃₀ stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v.880, p.189-202, 2000.
- SCHIERLE, J.; BRETZEL, W.; BÜHLER, I.; FACCIN, N.; HESS, D.; STEINER, K.; SCHÜEP, W. Content and isomeric ratio lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.*, v.59, p.459-465, 1997.

- STRINGHAM, J. M.; HAMMOND, B. R. Dietary lutein and zeaxanthin: possible effects on visual function. *Nutr. Rev.*, v.63, p.59-64, 2005.
- VAN DEN BERG, H.; FAULKS, R.; GRANADO, H. F.; HIRSCHBERG, J.; OLMEDILLA, B.; SOUTHON, S.; STHAL, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food. Agric.*, v.80, p.880-912, 2000.
- VENKATESWARAN, V.; FLESHNER, N. E.; SUGAR, L. M.; KLOTZ, L. H. Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. *Cancer Res.*, v.64, p.5891-5896, 2004.
- ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chem.* v. 101, 1543-1549, 2007.

Recebido para publicação em 09 de fevereiro de 2006

Aceito para publicação em 18 de agosto de 2006