

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Amostras**

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

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

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

##### **3.1.2. Aparatos**

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

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

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

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

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

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

##### **3.1.3. Reagentes e outros materiais**

Foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: metanol e acetonitrila (Tedia, USA), acetato de etila (Mallinckrodt, USA), ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Alemanha) e ácido acético (Vetec, Brasil). A água ultrapura foi produzida em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, USA). Reagentes grau de pureza para análise (p.a.): ácido metafosfórico (AMP) (Merck, Alemanha), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Mallinckrodt, USA), tampão Trizma (Nuclear, Brasil), sal etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Proquímios,

Brasil), fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sinth, Brasil), acetona, éter de petróleo, éter etílico, sulfato de sódio anidro, celite e óxido de magnésio.

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

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

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Delineamento experimental e análise estatística**

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

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

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

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

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

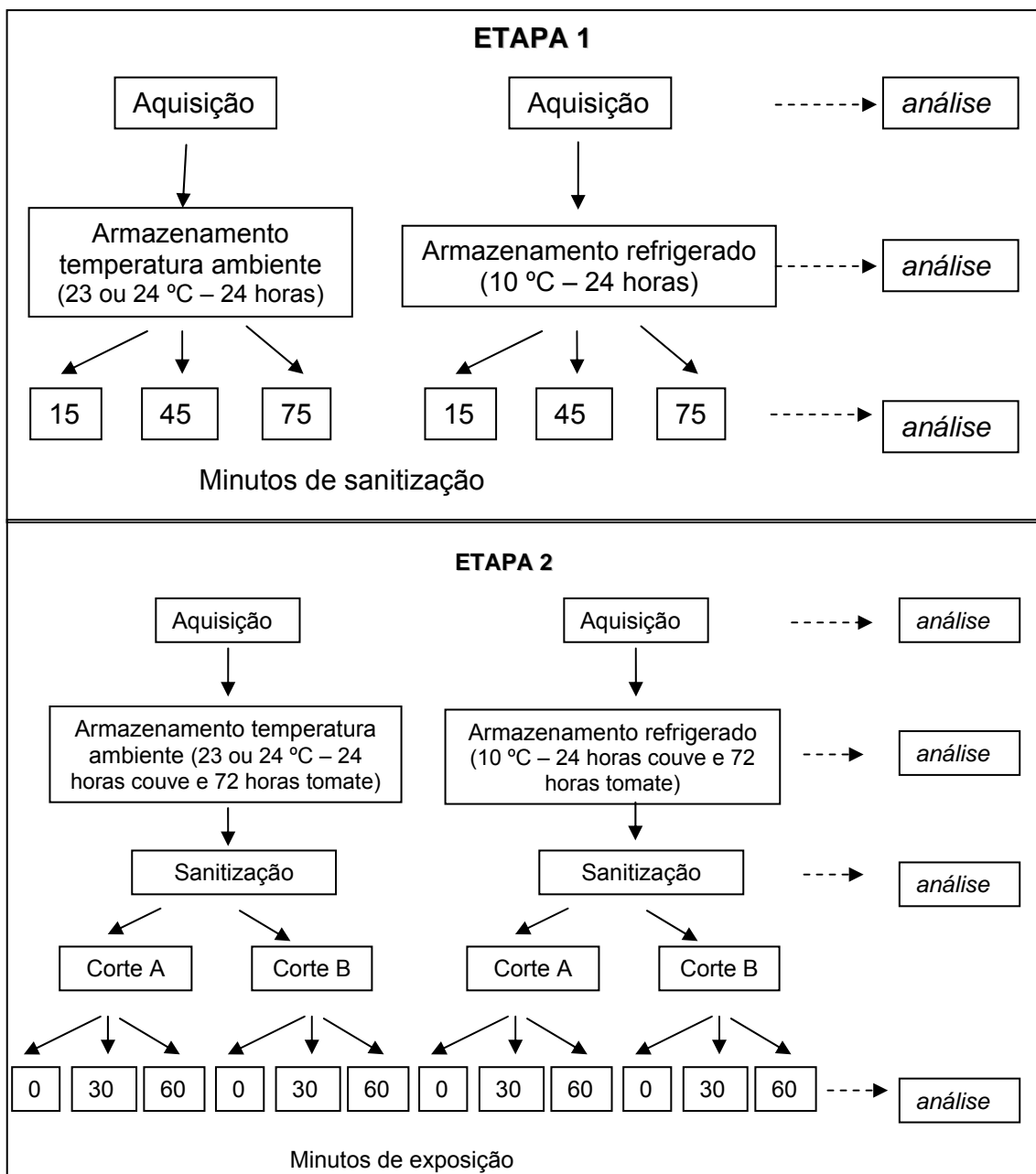


Figura 1. Esquema de análise e tratamentos das fases 1 e 2. Corte A: couve rasgada e tomate em meia-rodela. Corte B: couve em tiras e tomate em cubos.

### 3.2.2. Preparo das amostras

#### 3.2.2.1. Tomate

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

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

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

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

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

### **3.2.2.2. Couve**

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

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

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

### **3.2.3. Determinação de sólidos**

#### **3.2.3.1. Sólidos solúveis totais**

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

#### **3.2.3.2. Sólidos totais**

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

### **3.2.4. Extração**

#### **3.2.4.1. Ácido Ascórbico**

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

- 3 g de AMP foram dissolvidos em pequena quantidade de água ultrapura (cerca de 10 mL);
- 0,0294 g de EDTA foram dissolvidos em pequena quantidade de água ultrapura (cerca de 10 mL);
- 8 mL de ácido acético foram adicionados a balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 30 mL de água ultrapura;
- O AMP e o EDTA dissolvidos foram adicionados ao balão volumétrico e os bequers em que estes foram dissolvidos foram enxaguados com água ultrapura e esta água adicionada ao balão;
- 0,8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 90% foram adicionados lentamente ao balão volumétrico;
- Por último completou-se o volume para 100 mL de solução.

O procedimento de extração foi realizado conforme descrição a seguir:

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

#### **3.2.4.2. Carotenóides**

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

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

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

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

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

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

### **3.2.5. Isolamento dos padrões de licopeno e $\beta$ -caroteno**

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

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

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

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

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

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

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

### **3.2.6. Análise cromatográfica**

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

### 3.2.6.1. Curvas-padrão de ácido ascórbico, licopeno e $\beta$ -caroteno

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

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

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

A solução tampão fosfato foi preparada da seguinte forma:

- 2,57 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  foram diluídos em água até volume final de 100 mL;
- Em seguida, 1,5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  foram diluídos em água até volume final de 100 mL;
- Misturaram-se partes iguais das duas soluções obtidas e o pH foi checado em pHmetro digital (pH 2,0).

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

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

### 3.2.6.2. Análise de ácido ascórbico

Para análise de AA empregou-se a metodologia descrita por Franke et al (2004), com alterações. A fase móvel foi composta por: 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,0120 g para cada 100 mL) e 1 mM EDTA (0,0294 g para cada 100 mL), pH ajustado para 3.0 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . O fluxo foi ajustado a 1 ml/min, em eluição isocrática. A detecção foi realizada a 245 nm. A separação foi feita em coluna Lichospher 100 RP18, 250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m (Merck, Alemanha).

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

### 3.2.6.3. Análise de carotenóides

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

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

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

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

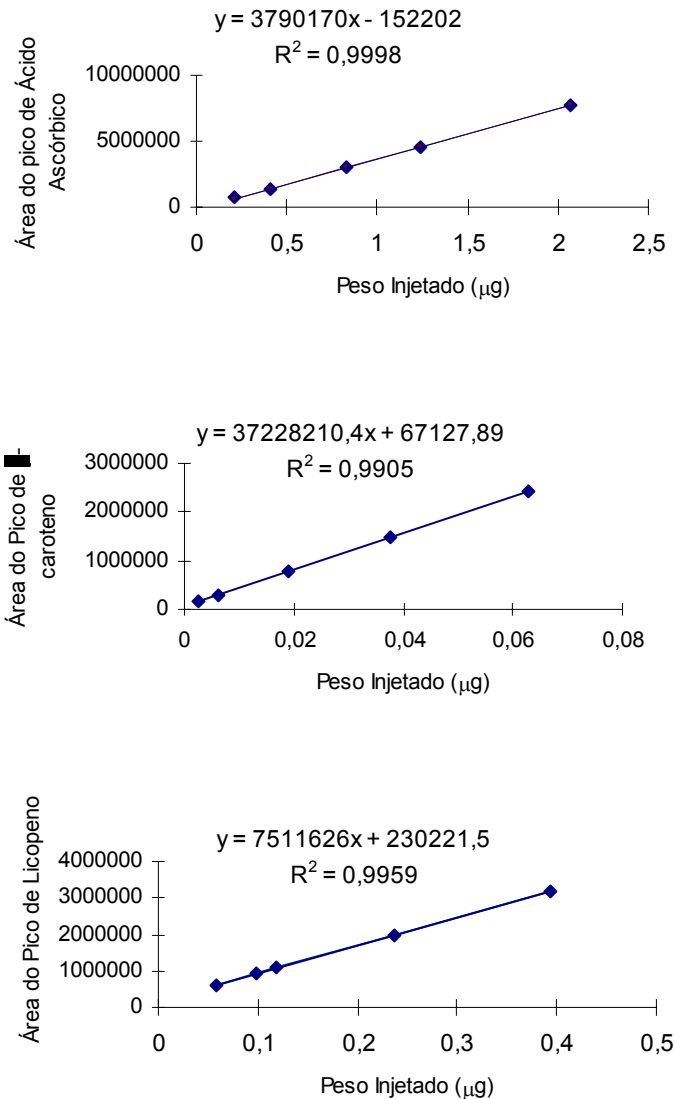


Figura 2. Curvas-padrão de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno

#### 3.2.6.4. Conversão de ácido desidroascórbico em ácido ascórbico

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

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

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

- A reação processou-se por 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
- Após os 10 minutos adicionou-se 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 M;
- Após filtração, injetou-se 30 µL das amostras.

A adição de tampão ao extrato elevou o pH para próximo à neutralidade. O H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi adicionado às amostras para reduzir novamente o pH antes da injeção cromatográfica.

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

Para as amostras de couve refogada foram utilizados 1,5 mL de tampão Trizma contendo 40 mM de DTT e 1 mL do extrato de couve refogada. O tempo e as condições de reação foram os mesmos usados para tomate e couve crua. Para reduzir novamente o pH antes da injeção foi necessário adicionar 1,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 M.

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

### **3.2.7. Testes de recuperação, linearidade e limite de detecção**

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

A determinação da faixa de linearidade foi feita pela injeção, em duplicata, de volumes crescentes das soluções padrão de AA, licopeno e β-caroteno, nas mesmas condições cromatográficas usadas para análise das amostras. Os dados obtidos para áreas dos picos na concentração usada para cada composto em estudo foram usados para análise de regressão linear. A avaliação da linearidade foi feita pelo coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>).

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

### **3.2.8. Cálculos**

#### **3.2.8.1. Retenção**

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

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

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

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

### 3.2.8.2. Valor de vitamina A

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

### Referências bibliográficas

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