



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

Contributo para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, de carotenoides, vitamina A e vitamina E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares.

MAFALDA ALEXANDRA MARINHO MACHADO SILVA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Rita Pacheco

Vogais:

Mestre Mariana Santos

Prof. Doutor Amin Karmali

Prof.^a Doutora Maria Celeste Serra

Dezembro de 2014



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

Contributo para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, de carotenoides, vitamina A e vitamina E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares.

MAFALDA ALEXANDRA MARINHO MACHADO SILVA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Rita Pacheco

Vogais:

Mestre Mariana Santos

Prof. Doutor Amin Karmali

Prof.^a Doutora Maria Celeste Serra

Dezembro de 2014

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica – ramo de Bioprocessos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP sob a orientação da Doutora Maria da Graça Dias e da Professora Doutora Maria Celeste Serra.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, por me ter proporcionado esta experiência tão enriquecedora, quer a nível profissional como a nível pessoal, e pelo financiamento do projeto.

Ao projeto *TDSExposure*, sem o qual este trabalho não seria possível realizar.

A todos os que fazem parte do Departamento de Alimentação e Nutrição por me terem recebido com tanta simpatia, e em especial à Doutora Maria Antónia Calhau, pela forma amável como me recebeu.

Às minhas orientadoras, Doutora Maria da Graça Dias e Doutora Maria Celeste Serra por todo o apoio, orientação, disponibilidade e amizade demonstrados ao longo destes meses de trabalho, e principalmente na sua fase final.

Aos meus colegas de laboratório, João Costa, Denise Costa e Rita Reis, por todo o apoio demonstrado nos momentos difíceis, pelas palavras de incentivo e por terem ouvido todos os meus receios e estarem sempre disponíveis para ajudar.

A todos os meus amigos, por estarem sempre disponíveis, pela amizade e pelo apoio demonstrados, e por ouvirem todos os meus medos, indecisões e pequenas conquistas, não só ao longo da realização deste trabalho mas também durante todo o meu percurso académico.

Por último, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais e irmão, por estarem sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida, por não me deixarem desistir e por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a continuar e a fazer mais e melhor. Obrigada pelo apoio, compreensão e amor incondicionais.

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se otimizar um método analítico que se encontra acreditado no laboratório no INSA para a determinação de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) em frutos e produtos hortícolas de forma a melhorar o seu controlo e estender o âmbito da sua aplicação à determinação simultânea das vitaminas A e E.

O processo analítico incluiu passos de extração dos analitos das respetivas matrizes e uma etapa de saponificação. A separação e quantificação dos analitos foram feitas através de um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase inversa, com deteção por UV/Vis para a vitamina A e carotenoides e por fluorescência para a vitamina E.

O método analítico foi ainda otimizado na perspetiva da redução de custos, através do desenvolvimento de um material de referência interno à base de cenoura, brócolos, pêsego e tomate. A homogeneidade do material foi comprovada para os carotenoides em estudo recorrendo a testes estatísticos, nomeadamente ao teste de Cochran e ao teste de “homogeneidade suficiente”.

Para alargar a gama de aplicação do método à determinação das vitaminas A e E foram determinados parâmetros de validação, nomeadamente limites de deteção e quantificação, sensibilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e exatidão. Os resultados obtidos permitiram concluir que o método validado é adequado para a análise das vitaminas A e E em diversas matrizes alimentares.

O método foi aplicado à análise de várias matrizes alimentares recolhidas no âmbito do projeto *TDSExposure*, sendo os resultados obtidos nesta tese um contributo para concretizar o objetivo final de avaliar a ingestão de carotenoides, vitamina A e vitamina E pela população portuguesa.

Tendo em consideração os conhecimentos adquiridos, no âmbito do projeto *Ibercarot* foram analisados diferentes artigos científicos sobre análise de carotenoides por HPLC de alimentos produzidos em países Ibero-Americanos, contribuindo para a elaboração de uma tabela da composição, em carotenoides, destes alimentos.

Palavras-chave: Carotenoides, Vitamina A, Vitamina E, validação, HPLC, material de referência interno, matrizes alimentares

Abstract

This work aims to optimize an analytical method that was previously accredited in the INSA laboratory for the determination of carotenoids (α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin, lycopene, lutein and zeaxanthin) in fruit and vegetables in order to improve their control and extend the scope of its application to the simultaneous determination of vitamins A and E.

The analytical process included extraction steps of the analytes of the respective matrices and a saponification step. The separation and quantification of the analytes have been made using a reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with detection by UV / Vis for vitamin A and carotenoids and fluorescence for vitamin E.

The analytical method has been optimized from the perspective of cost reduction through the development of an internal reference material based on carrots, broccoli, peaches and tomatoes. The homogeneity of the material was proven to carotenoids studied using statistical tests such as the Cochran test and the test of "sufficient homogeneity".

To extend the range of application of the method to the determination of vitamins A and E validation parameters were evaluated, including detection and quantification limits, sensitivity, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. The results showed that the validated method is suitable for the analysis of vitamins A and E in different food matrices.

The method was applied to the analysis of various food matrices gathered under *TDSExposure* project and the results obtained in this thesis contribute to achieve the ultimate goal of evaluating carotenoids, vitamin A and vitamin E intake by Portuguese population.

Taking into account the acquired knowledge, in the scope of Ibercarot project, scientific literature about carotenoids analysis by HPLC of food produced in Ibero-American countries was analysed, contributing to a carotenoid composition table of these foods.

Keywords: Carotenoids, Vitamin A, Vitamin E, validation, HPLC, internal reference material, food matrices

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1. Objetivos do Trabalho.....	1
2. Enquadramento do Tema	3
3. Introdução.....	5
3.1. Carotenoides	5
3.1.1. Carotenoides nos alimentos	6
3.1.2. Características dos carotenoides.....	7
3.1.3. Biodisponibilidade e metabolismo dos carotenoides.....	9
3.1.4. Efeitos dos carotenoides na saúde.....	11
3.1.4.1. Efeito pró-vitamina A	12
3.1.4.2. Efeito Antioxidante.....	13
3.1.4.3. Prevenção de doenças cardiovasculares.....	14
3.1.4.4. Prevenção da degeneração macular	14
3.1.4.5. Efeitos sobre o cancro	15
3.2. Vitamina A	16
3.2.1. Deficiência em vitamina A.....	17
3.3. Vitamina E	18
3.4. Métodos Analíticos para a Determinação de Carotenoides, Vitamina A e Vitamina E.....	20
3.5. Princípios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	24
3.5.1. Modos de Separação.....	25
3.6. Validação de um Método Analítico.....	26
3.7. Material de referência interno	37
4. Materiais e Métodos	41
4.1. Reagentes e Padrões	41
4.2. Equipamento	42
4.3. Preparação de soluções	44
4.3.1. Soluções de trabalho e fase móvel	44

4.3.2.	Soluções de padrões externos	45
4.3.3.	Soluções de padrões internos	48
4.4.	Amostras	48
4.4.1.	Preparação das amostras.....	49
4.4.1.1.	Extração	49
4.4.1.2.	Saponificação	50
4.4.2.	Análise cromatográfica	50
4.4.2.1.	Condições cromatográficas	50
4.4.2.2.	Identificação dos analitos	51
4.4.2.3.	Quantificação do teor dos analitos.....	51
4.5.	Etapas de validação do método.....	53
4.6.	Preparação do material de referência interno	54
5.	Resultados e Discussão	55
5.1.	Desenvolvimento de um material de referência interno para otimização do método acreditado para a determinação de carotenoides em frutos e produtos hortícolas	55
5.2.	Validação do método para a determinação das vitaminas A e E (Extensão do método acreditado para os carotenoides)	61
5.3.	Análise de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina), vitamina A e vitamina E em amostras do projeto <i>TDSExposure</i>	68
5.3.1.	Avaliação da vitamina A nas amostras que continham carotenoides	81
6.	Conclusão.....	83
7.	Proposta de trabalho futuro	85
8.	Referências Bibliográficas	87
Anexos	101
Anexo 1	102
Anexo 2	121
Anexo 3	121
Anexo 4	122
Anexo 5	152
Anexo 6	152
Anexo 7	159
Anexo 8	160
Anexo 9	164
Anexo 10	165
Anexo 11	168

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura química dos principais carotenoides existentes nos alimentos e no plasma humano.....	8
Figura 2 – Principais ações biológicas dos carotenoides	11
Figura 3 – Estrutura química da Vitamina A.....	16
Figura 4 – Estrutura química da Vitamina E.....	18
Figura 5 – Diagrama representativo dos diferentes componentes de um sistema de HPLC.....	24
Figura 6 – Material de referência interno.....	54
Figura 7 - Cromatograma do material de referência interno contendo 1 - luteína (tr=4,771 min), 2- zeaxantina (tr=5,220 min), 3 – β -apo-8'-carotenal (tr= 6, 333 min), 4 – β -criptoxantina (tr=8,558 min), 5 - licopeno (tr=13,431 min), 6 – α -caroteno (tr=16,406 min) e 7- β -caroteno (tr=18,213 min)	57
Figura 8 – Reta de calibração para a determinação da Vitamina A.....	62
Figura 9 – Reta de calibração para a determinação da vitamina E.....	62
Figura 10 – Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da vitamina A	63
Figura 11 - Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da vitamina E.	64
Figura 12 - Cromatograma da amostra de salada de frutas contendo 1 - luteína (tr=5,102 min), 2- zeaxantina (tr=5,694 min), 3 – β -apo-8'-carotenal (tr= 6, 066 min), 4 – β -criptoxantina (tr=8,120 min), 5 - licopeno (tr=11,252 min), 6 – α -caroteno (tr=13,856 min) e 7- β -caroteno (tr=15,067 min)	69
Figura 13 – Teores dos carotenoides e respetiva incerteza nos frutos analisados	71
Figura 14 – Teores de carotenoides e respetiva incerteza para amostras de leguminosas	74
Figura 15 – Teores de carotenoides em amostras de uvas resultantes de três colheitas	77
Figura 16 - Teores de carotenoides em diversos sumos de laranja	78
Figura 17 – Cromatograma da amostra de pão-de-ló contendo 1- vitamina A (tr = 3,581 min).....	79
Figura 18 - Cromatograma da amostra de uvas Abril/Maio 2014 contendo 1- vitamina E (tr= 6,662 min).....	80

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Fontes naturais dos principais carotenoides).....	6
Tabela 2 - Recomendações nutricionais de vitamina A	18
Tabela 3 – Recomendações nutricionais de vitamina E.....	19
Tabela 4 - Coeficientes de extinção dos carotenoides	46
Tabela 5 - Constituição das soluções padrão de trabalho para os carotenoides e respetiva concentração	47
Tabela 6 – Constituição das soluções padrão de calibração para a Vitamina A e Vitamina E e respetiva concentração.....	48
Tabela 7 – Condições aplicadas na eluição em gradiente.....	51
Tabela 8 - Teores dos carotenoides presentes nas amostras analisadas.....	56
Tabela 9 – Composição do material de referência interno.....	56
Tabela 10 - Teor em carotenoides nas amostras analisadas.....	57
Tabela 11 – Resultados do Teste de Cochran.....	58

Tabela 12 – Teste de análise de variâncias	59
Tabela 13 – Teor médio dos carotenoides (mg/100 g) no material de referência interno liofilizado e fresco	60
Tabela 14 - Valores de p para os carotenoides	60
Tabela 15 – Concentrações de vitamina A e vitamina E nas soluções padrão de calibração.....	61
Tabela 16 – Limites de deteção e quantificação para a vitamina A e vitamina E.....	64
Tabela 17 - Sensibilidade do método, desvio padrão e coeficiente de variação (CV)..	65
Tabela 18 – Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia	66
Tabela 19 – Teores de vitamina A e de vitamina E e respetivos z-score	67
Tabela 20 – Teores dos carotenoides presentes nas amostras analisadas	70
Tabela 21 – Teores de carotenoides em frutas (mg/100 g)	72
Tabela 22 – Teores em carotenoides em leguminosas (mg/100 g).....	74
Tabela 23 - Teores em carotenóides em alimentos processados	75
Tabela 24 - Teores dos carotenoides presentes nas três amostras de uvas analisadas	76
Tabela 25 - Teores dos carotenoides presentes nos quatro sumos de laranja analisados.....	78
Tabela 26 - Teores de vitamina A e vitamina E presentes nas amostras analisadas ..	80
Tabela 27 – Teor de vitamina A expresso em equivalentes de retinol presente nas amostras analisadas	82

Lista de Abreviaturas

- ACN- Acetonitrilo
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- AMD – *Age Macular Degeneration* (Degeneração Macular relacionada com a Idade)
- APCI – *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química à Pressão Atmosférica)
- BHT – Hidroxitolueno Butilado
- CV – Coeficiente de Variação
- DAD – *Diode Array Detector* (Detetor de Rede de Díodos)
- DAN – Departamento de Alimentação e Nutrição
- DCM – Diclorometano
- DDR – Dose Diária Recomendada
- ESI – *Electrospray*
- EtOH – Etanol
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução
- Iberocarot - *Iberoamerican network for the study of carotenoids as food ingredients*
- INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
- LD – Limite de Deteção
- LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade
- LQ – Limite de Quantificação
- MeOH- Metanol
- MRC – Material de Referência Certificado
- MS – Espetrometria de Massa
- ms – Matéria seca
- NIST - *National Institute of Standards Technology*
- NP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase normal
- R- recuperação do padrão interno
- RAE – Equivalente de Atividade do Retinol
- RE – Equivalente de Retinol
- ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)
- RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase inversa
- TDSExposure – *Total Diet Study Exposure*
- TEA- Trietilamina
- THF- Tetrahidrofurano
- UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
- UV/Vis – Ultravioleta/ Visível

1. Objetivos do Trabalho

O presente trabalho visou otimizar um método analítico acreditado no laboratório do INSA para a determinação de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) em frutos e produtos hortícolas de forma a estender o âmbito da sua aplicação à determinação simultânea da vitamina A e da vitamina E e a reduzir custos através do desenvolvimento de um material de referência interno. Os principais objetivos deste estudo foram:

- Otimização do método acreditado para a determinação de carotenoides em frutos e produtos hortícolas, nomeadamente, através do desenvolvimento de um material de referência interno;
- Contribuição para a validação do método para a determinação das vitaminas A e E;
- Contribuição para a avaliação da ingestão pela população portuguesa dos analitos em estudo através da determinação do teor de carotenoides em vários produtos alimentares recolhidos no âmbito do projeto *TDSExposure*;
- Criação de uma base de dados referente ao teor de carotenoides em alimentos produzidos em diferentes países ibero-americanos, no âmbito do projeto *Ibercarot*.

2. Enquadramento do Tema

Os carotenoides continuam a ser alvo de grande interesse desde a sua descoberta no século XIX. Inicialmente o interesse nestes compostos estava essencialmente ligado ao facto de serem pigmentos responsáveis pela cor de frutos e flores. Hoje em dia, está bem estabelecido que os carotenoides são compostos muito importantes e com grandes benefícios para a saúde humana, estando relacionados com a prevenção e diminuição do desenvolvimento de algumas doenças, tais como, doenças cardiovasculares, cancro e degeneração macular.

Estes compostos bioativos são também muito importantes, nos países em desenvolvimento e em determinadas dietas específicas, no tratamento da carência em vitamina A, visto que apresentam atividade pró-vitamina A. Dados os benefícios para a saúde humana, assim como o facto do teor de carotenoides variar consideravelmente de alimento para alimento e, dentro de cada espécie de produto, com a variedade, tipo de solo e clima, fazem com que seja de grande interesse a sua análise para inclusão em tabelas sobre a composição dos alimentos.

Com efeito existem atualmente dois projetos o *Ibercarot* (a nível ibero-americano) e o *TDSExposure* (a nível europeu).

No âmbito do projeto *Ibercarot*, financiado pela Rede Cyted, está a decorrer uma recolha de dados na literatura sobre os carotenoides em alimentos e refeições, frutos e legumes produzidos em diferentes países ibero-americanos para posterior compilação. Nessa base de dados vai constar informação relativa ao alimento ou refeição (nome científico, cor, processamento, produção), método de análise e teor de carotenoides.

O projeto *TDSExposure* é um projeto à escala europeia e financiado pela União Europeia, através do qual se pretende criar uma rede de estudos de dieta total (TDS) e melhorar e harmonizar a monitorização da exposição a substâncias químicas benéficas e prejudiciais presentes nos alimentos ingeridos diariamente.

Os estudos TDS são bastante importantes para a saúde e têm como objetivo cobrir a totalidade da dieta alimentar de forma a quantificar a ingestão diária aproximada de nutrientes e a exposição a contaminantes.

Em Portugal, trata-se de um projeto pioneiro, uma vez que nunca foi realizado um estudo TDS.

3. Introdução

3.1. Carotenoides

O termo carotenoide deriva do nome dado ao pigmento cor de laranja, caroteno, isolado pela primeira vez, em 1831, por Heinrich Wackenroder (1798-1854) a partir da cenoura. Em 1837, Berzelius designou por xantofilas os pigmentos amarelos que isolou das folhas amarelas do Outono. Mais tarde, em 1911 Tswett conseguiu separar carotenoides através de cromatografia (Omenn, 1998).

Os carotenoides são um grupo de mais de 700 pigmentos naturais, cujas cores variam entre o amarelo e o vermelho, que estão presentes nomeadamente em folhas, raízes, frutos, flores, sementes. Estes pigmentos participam na fotossíntese, tendo a função de auxiliar a captação de energia solar e promover a proteção contra a oxidação por parte da luz. Fornecem, também, às flores cores distintas com o objetivo de atrair insetos para a polinização e dispersão de sementes (Lu, 2008; Britton, 1995; Costa, 2010; Dias, 2009; Hornero-Méndez, 2000).

Estes compostos são sintetizados por plantas, algumas bactérias e fungos. Os animais são incapazes de sintetizar carotenoides e por isso, a sua principal fonte reside nos frutos e vegetais presentes na sua alimentação. São produtos intracelulares e encontram-se normalmente nas membranas das mitocôndrias, cromoplastos ou retículo endoplasmático (Atienza, 2007; Margalith, 1999; Okada, 2008).

Para além da atividade de pró-vitamina A de alguns carotenoides, um grande número de estudos epidemiológicos revela que o consumo de frutos e vegetais ricos em carotenoides reduz o desenvolvimento de inúmeras doenças degenerativas, nomeadamente, cancro, doenças cardiovasculares, cataratas e degeneração macular (Van Duyn, 2000; van den Berg, 2000; He, 2007).

Os carotenoides predominantes, tanto nos alimentos como no plasma humano, são o α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína, que juntamente com a zeaxantina, são os mais estudados em termos de benefícios para a saúde (Rodríguez-Amaya, 2004).

A indústria alimentar tem vindo a utilizar estes compostos como aditivos alimentares (ex.: β -caroteno- E160a; licopeno- E160d; luteína- E161b), de acordo com a legislação em vigor presente no Decreto-lei n° 193/2000 de 18 de Agosto.

3.1.1. Carotenoides nos alimentos

Embora os carotenoides estejam presentes em muitos produtos comuns da alimentação humana, as frutas, sumos e verduras constituem as suas principais fontes alimentares. Os produtos hortícolas fornecem a maior parte de α -caroteno e β -caroteno, sendo este último o mais distribuído entre os alimentos; frutas cor de laranja fornecem β -criptoxantina; vegetais de cor verde-escura fornecem luteína; o tomate fornece licopeno e a zeaxantina é fornecida pelo milho e bagas de Goji. A luteína e zeaxantina estão também presentes nas gemas de ovo (Gerster, 1997; Johnson, 2002; Paiva, 1999; Ong, 1992).

Na Tabela 1 estão apresentadas as fontes naturais dos principais carotenoides existentes nos alimentos.

Tabela 1 – Fontes naturais dos principais carotenoides (Tanaka, 2012; Krinsky, 2005; Rodriguez-Amaya, 2006)

Carotenoides	Fontes
α -caroteno	Abóbora, cenoura, brócolos, espinafre, vagem
β -caroteno	Melão, acerola, caju, nêspira, batata-doce, mandioca, cenoura, abóbora, espinafre, batata-doce, pimentão
β -criptoxantina	Nectarina, acerola, mamão, laranja, pêssego, tomate arbóreo, ervilhas, milho
Licopeno	Tomate, melancia, pitanga, pêssego
Luteína	Abóbora, pimentão, agrião, alface, brócolos, coentros, couve, rúcula, salsa, milho verde, camu-camu, pitanga
Zeaxantina	Nectarina, laranja, camu-camu, manga, milho, morango, couve, tomate arbóreo

Devido à sua natureza poli-insaturada, os carotenoides estão muito sujeitos a modificações, principalmente, a processos de oxidação. No entanto existem outros fatores, tais como a temperatura, luz e pH, que também podem produzir alterações e influenciar a cor dos alimentos e o seu valor nutricional (Rao, 2007).

Apesar de serem reconhecidos como tendo um papel muito importante na saúde humana, os carotenoides não têm um valor de dose diária recomendada (DDR) atribuído (Rao, 2007).

Os dados relativos à composição dos alimentos organizam-se em tabelas de composição de alimentos, ou bases de dados. Em geral, as bases de dados europeias não contêm informação sobre os carotenoides presentes nos alimentos.

3.1.2. Características dos carotenoides

Estruturalmente os carotenoides são tetraterpenóides C₄₀, formados a partir de oito unidades isoprenóides C₅ ligadas de forma que a sua sequência fique invertida no centro, originando uma molécula simétrica (Rodríguez-Amaya, 2001).

A ciclização e outras modificações, como por exemplo a hidrogenação, desidrogenação, isomerização, introdução de grupos funcionais contendo oxigénio, rearranjo, diminuição da cadeia ou a combinação destes processos, pode resultar numa grande diversidade de estruturas dos carotenoides (Rodríguez-Amaya, 2001; Oliver, 2000).

Deste modo, segundo a sua estrutura química, os carotenoides podem ser classificados em dois grupos distintos: os carotenos (α -caroteno, β -caroteno, licopeno), que são hidrocarbonetos lineares ou cíclicos, quer numa ou em ambas as extremidades da molécula, e os carotenoides oxidados ou xantofilas (β -criptoxantina, luteína, zeaxantina). Este segundo grupo é o mais complexo, quer em termos de número, quer em diferenças na estrutura dos compostos, os quais podem ser encontrados na sua forma livre (tal como os carotenos) ou na forma de ácidos gordos esterificados. Também nas suas extremidades podem apresentar grupos lineares ou cíclicos, por exemplo ciclo-hexano e ciclo-pentano (Oliver, 2000; Murillo, 2013; Atienza, 2007).

Na natureza, os carotenoides existem na sua forma mais estável, a forma *all-trans* (*all-E*). Este facto resulta de um maior impedimento estereoquímico junto dos átomos de hidrogénio e/ou grupos metil provocado pela presença de uma ligação *cis*, de forma que os isómeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis (Rodríguez-Amaya, 2001).

A Figura 1 apresenta a estrutura química dos principais carotenoides existentes nos alimentos.

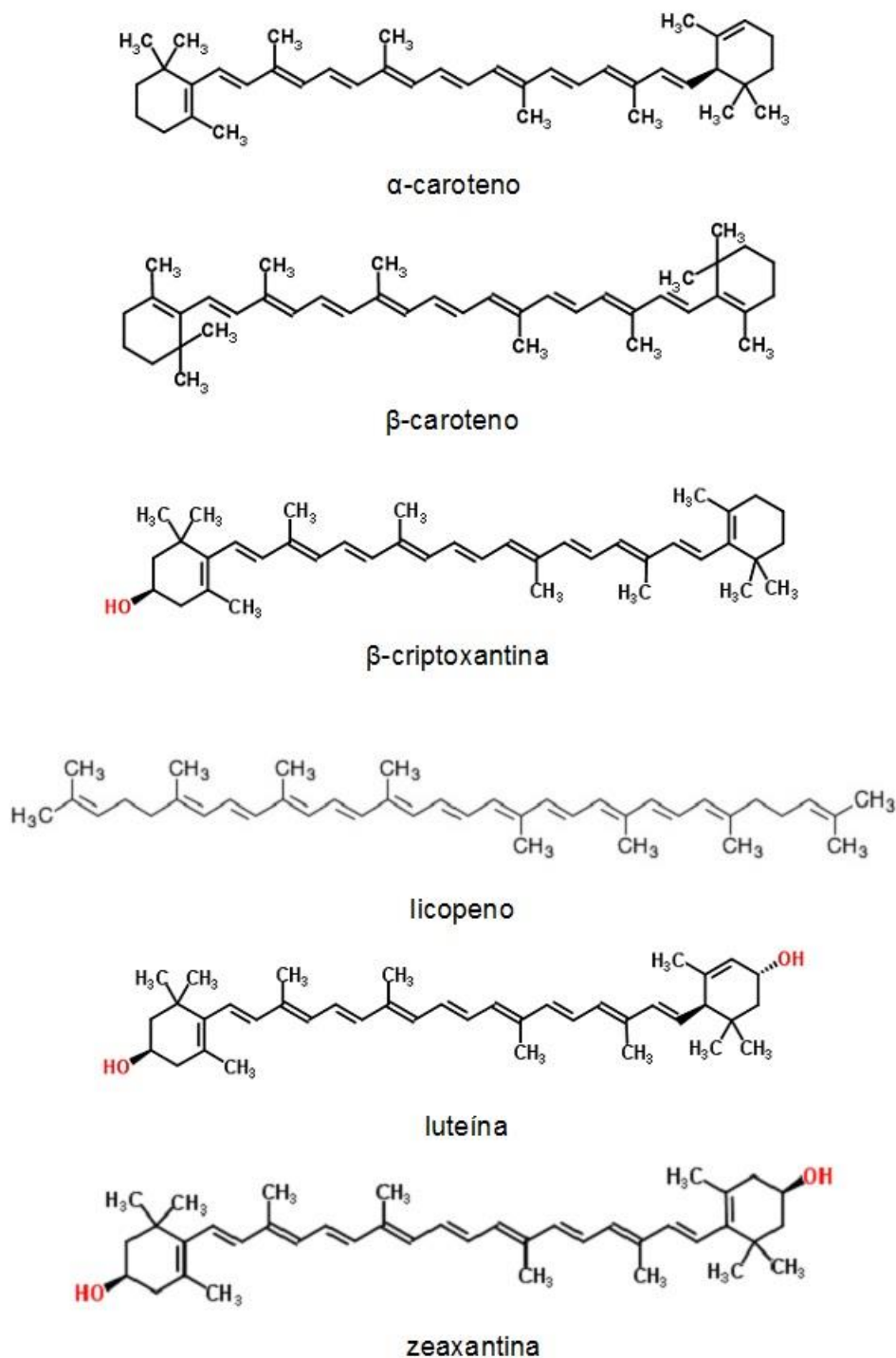


Figura 1 – Estrutura química dos principais carotenoides existentes nos alimentos e no plasma humano (adaptado de <http://www.chemspider.com/>)

Os carotenoides são moléculas lipofílicas praticamente insolúveis em água. São solúveis em solventes como acetona, éter etílico, tetra-hidrofurano (THF) e clorofórmio. Os carotenos são muito solúveis em éter de petróleo e *n*-hexano. Quanto às xantofilas, dissolvem-se melhor em metanol e etanol (Rodríguez-Amaya, 1997).

Os carotenoides exibem uma característica muito particular. Devido à existência do sistema de ligações duplas conjugadas localizado no centro da molécula apresentam uma grande variedade de cores, que vão desde o amarelo até ao vermelho intenso. O cromóforo permite a obtenção de um espectro de absorção na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) característico dos carotenoides bastante útil para a sua identificação e quantificação. Se o composto só tiver uma única ligação dupla conjugada, os comprimentos de onda estarão na gama do ultravioleta, pelo que não são compostos corados. Caso a molécula tenha várias ligações duplas conjugadas, o seu comprimento de onda de máxima absorção desloca-se para a região visível do espectro (400-600 nm) (Rodriguez-Amaya, 2001; Antunes, 2007).

O elevado número de ligações duplas é a principal causa da sua instabilidade, incluindo a sua predisposição para a ocorrência de oxidação e isomerização geométrica. O calor, a radiação e os ácidos promovem a isomerização dos carotenoides que se encontram na forma *all-trans* para a configuração *cis*. A oxidação é estimulada pela ação da luz, calor, metais, enzimas e do oxigénio. O principal passo da oxidação consiste na formação de epóxidos e apocarotenoides (carotenoides de cadeia curta). As condições necessárias para a isomerização e oxidação dos carotenoides são facilmente encontradas na preparação dos alimentos na própria casa dos consumidores, processamento industrial e armazenamento dos alimentos. Estes dois mecanismos são responsáveis pela perda de cor e do teor de vitamina A presente nos alimentos (Rodriguez-Amaya, 1997).

3.1.3. Biodisponibilidade e metabolismo dos carotenoides

Os carotenoides apresentam grandes benefícios na saúde humana. Para serem biologicamente ativos, os carotenoides necessitam de atingir o seu local de ação. É neste contexto que a bioacessibilidade e a biodisponibilidade são conceitos importantes a serem considerados (Parada, 2007).

A bioacessibilidade é descrita como a fração dos carotenoides ingeridos que é libertada a partir da matriz alimentar durante a digestão, tornando-se disponível para absorção intestinal. A biodisponibilidade refere-se à fração da quantidade de carotenoides ingerida que está disponível para funções biológicas ou para armazenamento no organismo humano (Parada, 2007).

É dada bastante atenção à biodisponibilidade uma vez que os potenciais efeitos benéficos dos carotenoides na saúde estão muito provavelmente relacionados com as suas concentrações nos tecidos e sangue, que por sua vez, estão relacionados com a eficiência de absorção e metabolismo. Estudar a biodisponibilidade dos carotenoides

é bastante complexo devido ao facto desta ser extremamente variável, sendo influenciada por vários fatores, tais como: quantidade e estrutura do carotenoide, natureza da matriz, preparação do alimento ou método de processamento, interação com outros carotenoides e a presença de outros componentes na dieta (a biodisponibilidade aumenta na presença de gordura mas diminui pela existência de fibra). Em relação ao indivíduo também existem fatores que influenciam os estudos sobre a biodisponibilidade, como por exemplo, o seu estado nutricional (a biodisponibilidade aumenta pela deficiência em vitamina A mas diminui pela deficiência em proteína), má absorção de lípidos, infeções e fatores genéticos (Stahl, 2005; Stinco, 2012; Rodriguez-Amaya, 2006).

Nos tecidos das plantas, os carotenoides encontram-se no interior das células, em organelos como os cromoplastos cuja estrutura precisa de ser destruída para que os carotenoides venham a ser absorvidos pelos enterócitos.

Uma vez que os carotenoides são de natureza lipofílica, a sua digestão ocorre em paralelo com a digestão lipídica. Uma absorção adequada dos carotenoides presentes numa dieta alimentar requer em primeiro lugar a digestão da matriz alimentar, por ação mecânica e enzimática. Em seguida, os carotenoides são solubilizados em micelas lipídicas formadas no trato gastrointestinal e são absorvidos pelas células da mucosa intestinal. Depois de absorvidos pelos enterócitos, os carotenoides são incorporados em quilomicrons e vão para o sangue, através do sistema linfático.

Os carotenoides podem também sofrer diferentes conversões durante a sua passagem através do trato gastrointestinal, como por exemplo a clivagem do β -caroteno em vitamina A (van der Berg, 2000; Castenmiller, 1998; Parker, 1996).

Os métodos para avaliar a biodisponibilidade devem incluir estudos em seres humanos e em animais. No entanto, os estudos feitos em seres humanos são bastante dispendiosos, muitas vezes invasivos, com um tempo de duração significativo e eticamente discutíveis. A adequação da utilização dos modelos animais para estudos desta natureza é questionável, uma vez que a biodisponibilidade, metabolismo e a utilização dos carotenoides são diferentes nos seres humanos e nos animais. Apesar disso, muitas pesquisas têm-se centrado em técnicas mais simples, como modelos *in vitro*. O modelo mais amplamente utilizado para avaliar a biodisponibilidade dos carotenoides, desenvolvido por Garrett *et al.*, é o modelo de digestão estática acoplada com uma absorção celular, em células Caco-2, simulando um pequeno ambiente intestinal, que permite estudar mecanismos de absorção e transporte (Roman, 2012; O'Connell, 2007; Lee, 1999; Garrett, 1999).

A maioria dos modelos utilizados neste tipo de estudo são modelos estáticos que não estudam a libertação dos carotenoides durante a digestão gástrica e não mimetizam os padrões de mistura e as forças que ocorrem no estômago devido à peristalse (Roman, 2012; O'Connell, 2007; Lee, 1999).

3.1.4. Efeitos dos carotenoides na saúde

Os carotenoides têm sido descritos na literatura como possuidores de propriedades bastante importantes não só para os organismos que os sintetizam, mas também para os animais e seres humanos. Têm muitas funções na resposta imunitária e no ciclo de visão. Há também uma crescente evidência do seu papel preventivo num elevado número de doenças crónicas ou relacionadas com a idade, devido, em parte, às suas propriedades antioxidantes (Biehler, 2010; Lu, 2008).

Tem sido descrito que estes compostos podem ajudar a diminuir o aparecimento e proliferação de vários tipos de cancro, incluindo o cancro no pulmão, próstata e cancro na mama. Também tem sido sugerido que alguns carotenoides, quando consumidos em frutas e vegetais, previnem doenças cardiovasculares e podem desempenhar um papel benéfico para a saúde óssea (Van Duyn, 2000; van den Berg, 2000; He, 2007).

Estas evidências estão diretamente relacionadas com o crescente interesse na relação entre a ingestão de carotenoides presentes na alimentação e as doenças degenerativas (Biehler, 2010).

No esquema da Figura 2 encontram-se algumas das principais ações biológicas dos carotenoides.

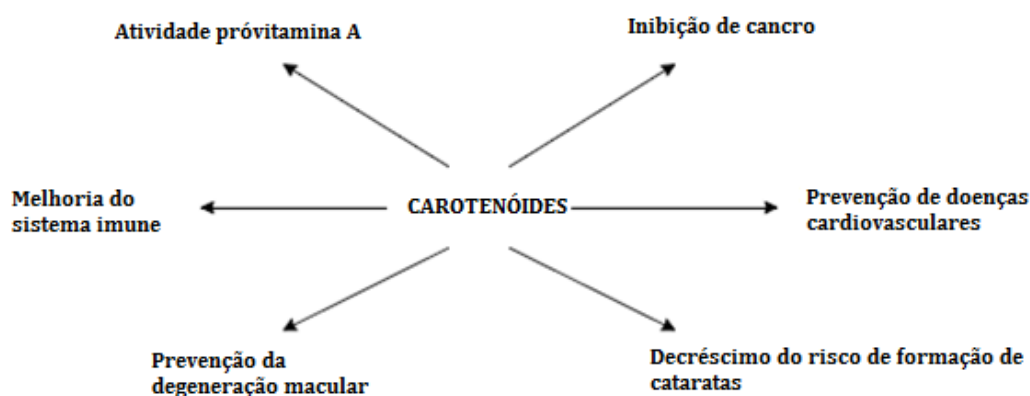


Figura 2 – Principais ações biológicas dos carotenoides (adaptado de Rodriguez-Amaya, 1997)

3.1.4.1. Efeito pró-vitamina A

A contribuição dos carotenoides com atividade pró-vitamina A para a ingestão diária de vitamina A depende dos hábitos alimentares e dos alimentos disponíveis. Estima-se que os legumes e frutas que contêm carotenoides contribuem com mais de 70% para a ingestão de vitamina A nos países em desenvolvimento; enquanto nas sociedades ocidentais a contribuição é bastante menor, sendo a maior fonte de vitamina A obtida a partir dos produtos de origem animal (Stahl, 2005; Tang, 2010).

Cerca de 50 das mais de 700 estruturas de carotenoides que são conhecidas, possuem atividade pró-vitamina A, como é o caso do β -caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina. Este tipo de carotenoides são encontrados principalmente em plantas, algas e microrganismos e podem ser metabolizados em vitamina A nos seres humanos e outros animais. Contudo, o tratamento térmico pode promover a isomerização do β e α -caroteno, aumentando a concentração dos isómeros *cis* com baixa atividade pró-vitamina A (Carvalho, 2012).

Devido à sua estrutura química, o requisito mínimo para que um carotenoide possua atividade pró-vitamina A é a existência de um anel β -ionona que não esteja substituído e uma cadeia poliénica com 11 átomos de carbono (Maia, 2006; Rodriguez-Amaya, 1997).

Os carotenoides são convertidos em retinol através da ação da enzima β -caroteno 15,15'-mono-oxigenase (EC 1.14.99.36) (Stahl, 2005).

Os fatores de conversão utilizados para calcular o teor de vitamina A a partir da pró-vitamina A foram definidos em 1989 e estabeleceram que 1 RE (equivalente de retinol) correspondia a 1 μg de retinol, 12 μg de α -caroteno, 12 μg de β -criptoxantina ou 6 μg de β -caroteno (National Research Council).

Em 2001, o *US Institute of Medicine* publicou as doses diárias recomendadas para a vitamina A baseando-se em novos fatores de conversão dos carotenoides com atividade pró-vitamina A, que foram avaliados segundo a eficiência de conversão do β -caroteno e a sua taxa de absorção (National Academy of Science, 2001). Foi, então, introduzido um novo conceito, o de equivalente de atividade do retinol (RAE). Cada RAE equivale a 1 μg de retinol, 12 μg de β -caroteno, 24 μg de α -caroteno ou 24 μg de β -criptoxantina (Campos, 2005).

Para o cálculo dos novos fatores de conversão foi estabelecido que a razão 2:1 correspondia à taxa de conversão do β -caroteno e que 6:1 correspondia à absorção do β -caroteno presente numa dieta rica em vegetais em relação à absorção do β -caroteno puro. Os fatores de conversão de α -caroteno e β -criptoxantina foram estabelecidos através de uma extrapolação baseada no facto destas moléculas

estruturalmente conterem o equivalente a apenas uma molécula de retinol e o β -caroteno conter o equivalente a duas moléculas de retinol (Campos, 2005).

Deste modo, o teor total de vitamina A pode ser calculada através da equação (1), que tem por base o teor de retinol, α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina presente em cada matriz alimentar (FAO/INFOODS, 2012):

$$\text{Vitamina A} = \text{retinol} + \frac{1}{12}\beta\text{-caroteno} + \frac{1}{24}\alpha\text{-caroteno} + \frac{1}{24}\beta\text{-criptoxantina} \quad (1)$$

3.1.4.2. Efeito Antioxidante

Os carotenoides são capazes de inativar espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e podem, portanto, ajudar a retardar ou prevenir os danos oxidativos. Esta propriedade dos carotenoides está associada a um menor risco de desenvolvimento de certas doenças crónicas, como é o caso do cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose, uma vez que o processo de oxidação está envolvido nas etapas iniciais do seu desenvolvimento (Young, 2001; Yeum, 2004; Kelemen, 2006).

As ROS formam-se durante o metabolismo aeróbio e processos patológicos. Os seus principais alvos são os lípidos insaturados que se encontram nas membranas celulares. Um ataque mediado por radicais livres às membranas lipídicas pode iniciar uma reação em cadeia, resultando em primeiro lugar na peroxidação lipídica e, finalmente, em danos significativos nas membranas, enzimas e ácidos nucleicos (Bendich, 1989; Yeum, 2004).

O metabolismo humano exibe um sistema de defesa antioxidante que envolve enzimas e proteínas para neutralizar as ROS e evitar esses efeitos. No entanto, estas defesas podem ser insuficientes sob certas circunstâncias e pode ocorrer *stress* oxidativo (Park, 2003).

Os carotenoides são, provavelmente, os compostos mais envolvidos na eliminação do oxigénio molecular singleto e dos radicais peróxil (Young, 2001).

O mecanismo de ação dos carotenoides consiste em capturar o oxigénio singleto, com a libertação de energia sob a forma de calor. Essa capacidade de captura depende do número de ligações duplas conjugadas presentes na estrutura do carotenoide (Shami, 2004).

3.1.4.3. Prevenção de doenças cardiovasculares

A doença arterial coronária, ou também denominada aterosclerose, é uma das principais causas de mortalidade nos países desenvolvidos. De entre os fatores de risco desta doença encontram-se a hipertensão, hipercolesterolemia e o tabagismo (Kritchevsky, 1999; Tapiero, 2004; Goulinet, 1997; Kohlmeier, 1997).

Existem evidências de que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas por oxidação estão envolvidas na iniciação desta doença. Os antioxidantes naturais presentes na dieta alimentar podem inibir a modificação oxidativa das LDL e diminuir a progressão da doença cardíaca coronária humana (Kritchevsky, 1999; Tapiero, 2004; Goulinet, 1997; Kohlmeier, 1997).

Desde que se sabe que o β -caroteno e o licopeno são transportados principalmente em LDL, que se tem sugerido que estes dois carotenoides se encontram numa posição privilegiada para proteger estas proteínas contra a oxidação. Em alguns estudos concluiu-se que apenas o licopeno contribuía para esse efeito protetor (Kritchevsky, 1999; Tapiero, 2004; Goulinet, 1997; Kohlmeier, 1997).

O licopeno é considerado o carotenoide com maior capacidade antioxidante. Vários estudos revelam que o licopeno protege moléculas lipídicas, LDL, proteínas e ADN (Ácido desoxirribonucleico) contra o ataque de radicais livres (Porrini, 2005; Miller, 1996; Mortensen, 1997).

3.1.4.4. Prevenção da degeneração macular

A degeneração macular relacionada com a idade (*Age-Related Macular Degeneration* - AMD) é uma das principais causas, nos países desenvolvidos, de cegueira irreversível em idosos e afeta cerca de 20% da população acima dos 65 anos (Murillo, 2010; Congdon, 2004).

A AMD é um processo degenerativo progressivo da mácula, que tem como alvo uma monocamada de células pigmentares existentes na retina. Esta doença destrói a retina e provoca uma perda da visão central (Wegner, 2011).

A mácula faz parte da retina e é a zona onde existe máxima acuidade visual e que é responsável pela perceção de cor. Os carotenoides responsáveis pela coloração deste tecido são a luteína e a zeaxantina, cuja concentração é relativamente maior do que no resto da retina (Chucair, 2007; Snodderly, 1995).

A falta de luteína e zeaxantina na dieta está associada a um aumento do risco da AMD. Há cada vez mais estudos que evidenciam que estes dois carotenoides

podem prevenir e/ou retardar esta doença degenerativa (Chucair, 2007; Snodderly, 1995).

A luteína e zeaxantina atuam na retina como poderosos antioxidantes, limitando os danos do *stress* oxidativo para as células da retina e inibindo a apoptose (Chucair, 2007; Snodderly, 1995).

O interesse por estes dois carotenoides tem crescido consideravelmente nos últimos anos, principalmente devido ao seu papel na visão dos seres humanos (Granado, 2003).

3.1.4.5. Efeitos sobre o cancro

O cancro é o maior problema de saúde pública em muitos países do mundo. Em Portugal, morrem, por ano, cerca de 42 mil pessoas com cancro (Siegel, 2012; Liga Portuguesa contra o Cancro, 2009).

Entre as possíveis causas de cancro, os danos provocados no ADN e em outros componentes celulares pelas ROS parecem ser a maior causa do aparecimento e desenvolvimento desta doença. Estas espécies podem induzir mutações, oxidar lípidos e proteínas e alterar os sinais de transdução, efeitos que promovem o desenvolvimento desta doença (Borek, 2004).

A alimentação tem um papel bastante importante. Uma dieta rica em alimentos que contenham compostos com atividade antioxidante reduz o risco de certos tipos de cancro (Borek, 2004).

Estudos sobre a ação do β -caroteno têm demonstrado que este carotenoide inibe a proliferação de células cancerígenas devido à sua atividade antioxidante e à capacidade de se converter em vitamina A. No entanto, foi também verificado que alguns fatores adjacentes, como por exemplo o tabaco, podem influenciar o β -caroteno no seu mecanismo de ação, fazendo com que este tenha exatamente uma ação oposta à pretendida. Com o objetivo de esclarecer estas controvérsias, foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* em animais, nomeadamente em furões, uma vez que este animal mimetiza o metabolismo do β -caroteno em humanos. Os resultados revelaram que elevados níveis de β -caroteno em animais expostos ao fumo do tabaco, criava condições extremamente oxidativas, propícias à oxidação do β -caroteno. Os metabolitos resultantes dessas reações promoviam a destruição do ácido retinóico, induzindo a ativação da carcinogénese. Tudo indica que a explicação para este facto reside na dose de β -caroteno ingerida. Ao que parece doses elevadas de β -caroteno, muito superiores às existentes naturalmente nos alimentos, favorecem o processo de

carcinogênese, sendo que tal não se verifica quando se ingerem doses mais reduzidas (Tang, 2012; Brenner, 1994; Russell, 2002).

3.2. Vitamina A

Vitamina A (Figura 3) é um termo genérico que abrange um certo número de substâncias lipossolúveis, tais como retinol, retinal, ácido retinóico e éster de retinilo. Estas substâncias são essenciais no organismo humano, desempenhando várias funções ao nível do desenvolvimento embrionário, visão e crescimento, assim como, ao nível de vários órgãos como coração, pulmões e rins (Msagati, 2013).

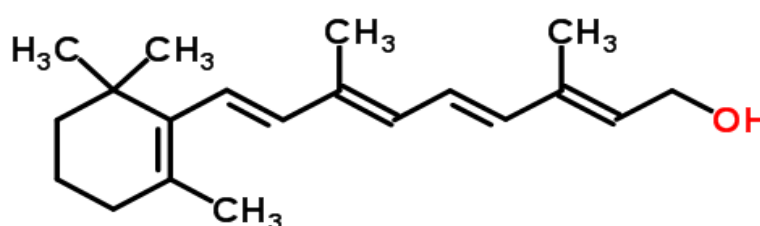


Figura 3 – Estrutura química da Vitamina A (adaptado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393012.html?rid=feef0575-7f9c-4e7c-9ef2-c63584bad451>)

A vitamina A encontra-se em produtos de origem animal, tais como ovo, óleo de fígado de peixe, fígado dos mamíferos, leite e seus derivados, assim como em vegetais e frutas sob a forma de pró-vitamina A (Leboulanger, 1978).

O retinol e os seus ésteres são insolúveis em água mas facilmente solúveis em éter, clorofórmio, acetona, gorduras e óleos. São facilmente degradados pela ação da luz, oxigénio e ácidos, tal como os carotenoides (Msagati, 2013; National Institute of Health, 2013).

A vitamina A é absorvida a partir do intestino, esterificada e armazenada no fígado, e libertada em quantidades controladas que mantêm os níveis estáveis de retinol no plasma, encontrando-se, na sua maioria, ligado à proteína transportadora de retinol (*Retinol Binding Protein* RBP –) produzida no fígado (Omenn, 1998).

3.2.1. Deficiência em vitamina A

A deficiência em vitamina A é um dos maiores problemas nutricionais em muitos países em desenvolvimento e afeta cerca de 250 milhões de crianças com idades inferiores a 5 anos e mulheres em idade reprodutiva (WHO, 2014; Ekesa, 2012).

A carência desta vitamina manifesta-se principalmente por alterações a nível dos órgãos e tecidos de origem ectodérmica. O olho é atingido precocemente, sendo um dos primeiros sinais a cegueira crepuscular, que é acompanhada, geralmente, por uma diminuição na taxa plasmática de retinol e que reage rapidamente à administração de vitamina A (Lebouranger, 1978).

A nível do revestimento cutâneo, a carência em vitamina A manifesta-se pelo aspeto de desidratação da pele com atrofia das glândulas sebáceas e sudoríparas e chegando à hiperqueratose, que dá à pele um carácter rugoso ou áspero ao tato (Lebouranger, 1978).

Também estão relacionados com o défice de retinol, a anemia, bem como um aumento da sensibilidade às doenças infecciosas e uma diminuição da resistência ao *stress* (Lebouranger, 1978).

A fortificação dos alimentos com vitamina A é uma das estratégias tradicionais para tratar a deficiência desta vitamina.

Para os países cujas populações dependem da agricultura, a principal estratégia sustentável de fazer face a este problema é a utilização de alimentos de origem vegetal que sejam uma fonte de carotenoides com propriedades pró-vitamina A. Existe, então, a necessidade de promover uma maior diversidade alimentar, através da produção e consumo de legumes e frutas. Este facto é um dos fatores que faz com que a pesquisa de carotenoides em alimentos seja tão importante (Lu, 2008; Lozano-Alejo, 2007; Ruel, 2001).

Segundo o Regulamento nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu de 25 de Outubro de 2011 a DDR para a vitamina A a considerar em termos de rotulagem é de 800 µg. No entanto, as recomendações nutricionais referentes à ingestão individual de vitamina A variam de acordo com a idade, género e na mulher, também, consoante o período reprodutivo em que se encontra (Tabela 2).

Tabela 2- Recomendações nutricionais de vitamina A (adaptado de National Academy of Science,2001)

	Idade	µg/dia
Lactentes	0 a 6 meses	400
	7 a 12 meses	500
Crianças	1 a 3 anos	300
	4 a 8 anos	400
	9 a 13 anos	600
Homens	Acima de 14 anos	900
Mulheres	Acima de 14 anos	700
	Grávidas ≤ 18 anos	750
	Grávidas acima dos 19 anos	770
	Lactação ≤ 18 anos	1200
	Lactação acima de 19 anos	1300

3.3. Vitamina E

Vitamina E (Figura 4) é um termo coletivo utilizado habitualmente para designar as diferentes formas de tocoferol que apresentam atividade antioxidante. Esta vitamina ocorre naturalmente em oito formas, α , β , γ e σ tocoferol e respetivos análogos insaturados, tocotrienóis. O α -tocoferol encontra-se na natureza mais frequentemente e apresenta uma atividade biológica mais elevada. Os β e γ - tocoferol apresentam uma atividade vitamínica reduzida, enquanto o σ -tocoferol é praticamente inativo (Gimeno, 2000; Leboulanger, 1978; Siluk, 2007).

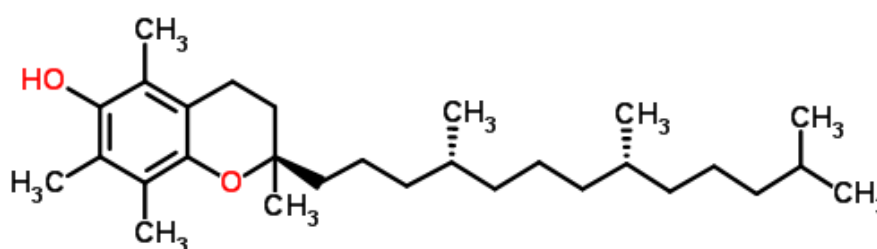


Figura 4 – Estrutura química da Vitamina E (adaptado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14265.html?rid=fe18dcd0-edcb-4d3b-ad02-27aa31d96b62>)

Os tocoferóis, à temperatura ambiente, apresentam-se sob a forma de um líquido amarelo viscoso. Estes compostos são insolúveis em água, solúveis em gorduras e óleos, assim como em solventes orgânicos, como éter, clorofórmio e acetona, e particularmente sensíveis à luz solar e à oxidação (Leboulanger, 1978).

É possível encontrar a vitamina E sob a forma não esterificada e as suas principais fontes são óleos vegetais, nozes, sementes, frutas, cereais e vegetais de folhas verdes (Hoppe, 2000).

Esta vitamina apresenta um papel importante na saúde humana pois desempenha um papel preventivo em doenças associadas ao *stress* oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, cancro, cataratas, degeneração macular relacionada com a idade e tem uma grande importância em funções como o crescimento, reprodução, e na proteção da integridade dos tecidos (Siluk, 2007).

A existência de deficiência de vitamina E é rara e não foram encontrados sintomas evidentes em pessoas saudáveis que obtêm um baixo teor de vitamina E através da sua dieta alimentar. No entanto, esta deficiência pode ocorrer em caso de má absorção da gordura ou em prematuros, sendo geralmente caracterizada por problemas neurológicos (<http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/>; Rao, 2013).

Segundo o Regulamento nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu de 25 de Outubro de 2011 a DDR para a vitamina E a considerar em termos de rotulagem, é de 12 mg. Contudo, as recomendações nutricionais referentes à ingestão individual de vitamina E também, variam de acordo com a idade, género e na mulher, também, com o período reprodutivo em que se encontra (Tabela 3).

Tabela 3 – Recomendações nutricionais de vitamina E (adaptado de National Academy of Science, 2001)

	Idade	mg/dia
Lactentes	0 a 6 meses	4
	7 a 12 meses	5
Crianças	1 a 3 anos	6
	4 a 8 anos	7
	9 a 13 anos	11
Homens	Acima de 14 anos	15
Mulheres	Acima de 14 anos	15
	Grávidas	15
	Lactação	19

3.4. Métodos Analíticos para a Determinação de Carotenoides, Vitamina A e Vitamina E

A identificação e análise quantitativa dos carotenoides constituem um desafio devido à sua semelhança química, instabilidade face à presença de luz, oxigénio e calor e à sua grande variabilidade. A falta de padrões disponíveis comercialmente e o elevado preço dos disponíveis, as baixas concentrações normalmente existentes em amostras biológicas e a presença de compostos interferentes tornam o desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação e quantificação de carotenoides em amostras de alimentos um processo difícil (Van Breemen, 2012).

Inicialmente, a análise cromatográfica de carotenoides era realizada em coluna aberta, à pressão atmosférica, necessitando de uma grande quantidade de amostra (Quirós, 2006).

Com base nas propriedades químicas e físicas destas moléculas e aproveitando o grande desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC), este tornou-se o método mais comum para a determinação de carotenoides, tanto qualitativa como quantitativamente (Rivera, 2012).

O detetor mais frequentemente utilizado neste sistema cromatográfico é o detetor de UV-Vis e mais recentemente o detetor de rede de díodos (*Diode Array Detector* - DAD), que permite a obtenção de cromatogramas em vários comprimentos de onda selecionados para os diferentes componentes (Chauveau-Duriot, 2010; Huck, 2000).

Para a análise de carotenoides, tanto se pode utilizar sistemas de fase normal (NP-HPLC) como de fase inversa (RP-HPLC), em modo isocrático ou gradiente.

No entanto, a maioria das separações destes compostos é feita através de RP-HPLC utilizando colunas C8 e C18, sendo que estas colunas têm uma baixa resolução para os isómeros *cis* e *trans*. As colunas C18 conseguem fornecer uma boa separação para uma grande variedade de analitos, em especial para aqueles que possuem cadeias curtas e com baixos pesos moleculares.

Por outro lado, as colunas C30 proporcionam melhores separações dos isómeros geométricos e de analitos de cadeia longa do que as colunas C8 e C18. As colunas C30 são uma boa escolha para separar isómeros geométricos do licopeno e β -caroteno e carotenoides menos polares. No entanto, quando utilizada para a separação de outros carotenoides, obtém-se, em geral, cromatogramas semelhantes

aos obtidos com a coluna C18, mas com tempos de análise bastante superiores (Rivera, 2012; Daood, 2013).

O acetonitrilo é o solvente mais utilizado devido à sua reduzida viscosidade, baixa absorção sob a luz UV e pelo facto de não induzir pressões muito elevadas na coluna. Por outro lado, o metanol proporciona recuperações mais elevadas, sendo também menos tóxico e menos dispendioso (Amorim-Carrilho, 2014).

Por vezes são utilizadas pequenas percentagens de solventes menos polares para melhorar a resolução e aumentar a solubilidade dos analitos, incluindo água, 2-propanol, acetona, acetato de etilo, THF, diclorometano (DCM) e clorofórmio (Rivera, 2012; Rodriguez-Amaya, 2004).

A eluição dos carotenoides pode ser isocrática ou em gradiente. Embora os sistemas de gradiente melhorem a resolução da análise, aumentando a sensibilidade, apresentam algumas desvantagens, uma vez que tornam a análise mais complexa e requerem equipamento dispendioso. A eluição isocrática apresenta algumas vantagens muito importantes tais como um menor tempo total de análise, uma vez que não é necessário equilibrar a coluna após cada injeção. Assim, os métodos isocráticos são mais adequados para análises de rotina. Além disso, a reprodutibilidade da análise é maior devido a uma menor variação dos tempos de retenção (Meléndez-Martínez, 2007).

Recentemente foram observadas melhorias no desempenho cromatográfico utilizando o método de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC). Este método utiliza colunas de menor diâmetro cujo enchimento são partículas muito pequenas (inferior a 2 μm). Enquanto em HPLC a pressão é da ordem dos 35-40 MPa, dependendo do aparelho, em UHPLC a pressão pode chegar até 103,5 MPa. UHPLC apresenta várias vantagens em relação a HPLC, tais como análises mais rápidas (com tempos de retenção mais curtos), obtenção de picos mais estreitos (permitindo uma relação sinal-ruído maior) e maior sensibilidade.

Vários métodos de HPLC já foram adaptados para UHPLC. Esse facto faz com que esta técnica seja uma ferramenta altamente promissora para a otimização da separação e posterior quantificação de carotenoides, enquanto economiza no tempo de análise e nos solventes necessários.

Chauveau-Duriot *et al.*, num dos primeiros estudos sobre a separação de carotenoides utilizando um sistema cromatográfico de UHPLC, validou a transferência de um método de HPLC, utilizado para analisar em simultâneo vitamina A, vitamina E e carotenoides para um sistema de UHPLC, apresentando melhores resultados na qualidade de separação dos analitos. Não se verificaram, no entanto, tempos de

análise mais curtos devido à dificuldade em separar os carotenoides de matrizes complexas (Chauveau-Duriot, 2010; Rivera, 2012).

Em HPLC, os detetores mais utilizados são os UV-Vis ou DAD. No entanto, uma vez que os espectros de muitos carotenoides são semelhantes e um grande número de moléculas são eluídas ao mesmo tempo, tem-se vindo a complementar a identificação dos carotenoides com outros métodos de deteção, como por exemplo espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS) (Rivera, 2012).

Desde o trabalho pioneiro realizado por Schwieter *et al.* (1965), que o método de MS, devido à sua elevada sensibilidade e seletividade, tem sido uma opção para a deteção destes compostos. Esta técnica apresenta grandes vantagens para estas análises, incluindo a obtenção de informação sobre a sua estrutura, baseada na massa molecular e no seu padrão de fragmentação. Estas vantagens facilitam a quantificação de carotenoides que eluem ao mesmo tempo. Em geral esta técnica exige técnicos muito experientes na interpretação de resultados devido à simetria das moléculas de carotenoides e à grande quantidade de combinações possíveis (Rivera, 2012; Rivera, 2013).

O padrão de fragmentação depende não só da composição da fase móvel, mas também da técnica de ionização utilizada. Esta abordagem é útil para distinguir carotenoides com a mesma massa molecular mas diferentes padrões de fragmentação (isómeros estruturais e geométricos). De entre as técnicas de ionização compatíveis com LC-MS, as mais utilizadas são o *electrospray* (*Electrospray Ionization* - ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization* - APCI), devido à sua simplicidade e acoplamento direto com o espectrómetro de massa (Breemen, 2012; Rivera, 2011).

APCI tornou-se a técnica de ionização de carotenoides mais amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e capacidade de ionizar compostos não polares. Hao *et al.* relataram que a deteção de β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina em amostras botânicas é 100 vezes mais sensível utilizando APCI em vez de ESI (Hao, 2005; Rivera, 2013).

Um método alternativo para a separação destes compostos baseia-se na utilização de fluídos supercríticos como fases móveis, que são substâncias existentes a temperaturas e pressões acima do seu valor crítico e que possuem baixa viscosidade e elevada difusividade. A cromatografia de fluído supercrítico é caracterizada por ser uma técnica rápida e amiga do ambiente, requerer pequenas quantidades de solvente e pelo fato de ter mostrado uma grande capacidade de separação, especialmente de isómeros *cis* e *trans*. O dióxido de carbono é normalmente utilizado como fase móvel, devido ao facto de não ser tóxico nem reativo e ser de baixo custo. No entanto a baixa

solubilidade destes compostos em dióxido de carbono constitui uma dificuldade difícil de ultrapassar (Matsubara,2009; Bijttebier,2014; Wada,2011; Matsubara,2012).

A cromatografia líquida bidimensional é uma abordagem introduzida recentemente, baseada na combinação de duas etapas independentes de separação com seletividade ortogonal. Nesta técnica, toda a amostra é analisada duas vezes, de uma forma independente. Existem duas colunas ligadas em série, por meio de uma válvula utilizada como sistema de transferência. A função desta válvula é isolar, continuamente, as frações eluídas da primeira coluna, e permitir a sua injeção na segunda coluna (Dugo,2006; Dugo,2008).

A primeira aplicação desta técnica foi para elucidar o padrão de carotenoides existente em sumo de laranja, utilizando uma coluna de sílica de fase normal como primeira dimensão, e uma coluna monolítica C18 de fase inversa como segunda dimensão. Mais recentemente, Cacciola *et al.* utilizaram um sistema de UHPLC com uma coluna de micro boro-ciano na primeira dimensão, e uma coluna C18 com enchimento de partículas de núcleo fundido, para analisar a composição de pimentão vermelho (Cacciola,2012; Dugo,2006).

Embora estas técnicas tenham apresentado grandes possibilidades de realizar separações complexas de carotenoides, os tempos de análise têm sido um problema, visto que são necessárias análises com cerca de 140 min e equipamentos muito complexos e dispendiosos (Dugo,2009; Bijttebier,2014).

As vitaminas lipossolúveis existentes nos alimentos são geralmente determinadas por métodos cromatográficos distintos e morosos. Os tocoferóis e tocotrienóis podem ser separados e quantificados por NP-HPLC com detecção por fluorescência. A utilização de RP-HPLC para separar estes compostos em alimentos é menos frequente, devido à sua baixa eficiência de separação; o α e σ -tocoferol podem ser separados mas o β e γ -tocoferol co-eluem. A vitamina A pode ser separada utilizando RP-HPLC com detecção UV-Vis ou de fluorescência (Salo-Väänänen, 2000).

Existem muitos métodos de HPLC para separar carotenoides e/ou vitamina E e A, mas a maioria desses métodos são morosos e dispendiosos, difíceis de se utilizar em análises de rotina e são apenas aplicáveis de forma viável a amostras específicas. Recentemente, Gleize *et al.* desenvolveram um método rápido e simples utilizando HPLC de fase inversa, capaz de determinar simultaneamente retinol, tocoferol, carotenoides e coenzima Q₁₀, em amostras alimentares complexas. Plozza *et al.* conseguiram determinar simultaneamente vitamina A, E e β -caroteno presentes no leite através do método de HPLC com detecção por MS (Plozza, 2012; Gleize, 2012).

No Anexo 1 encontram-se alguns dos métodos reportados na literatura para a determinação de carotenoides, vitamina A e vitamina E, nas mais variadas matrizes alimentares.

3.5. Princípios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é hoje em dia uma das técnicas mais poderosas em qualquer laboratório analítico. É possível identificar e quantificar componentes presentes em qualquer amostra, tais como, medicamentos, alimentos, nutracêuticos, produtos químicos industriais, cosméticos, entre outros (Claessens, 2004).

A separação pode ser baseada em mecanismos de adsorção, partição e permuta de iões, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. Esta técnica envolve uma fase estacionária, que se encontra numa coluna de aço inoxidável, e uma fase móvel líquida (WHO, 2008).

O equipamento para este tipo de cromatografia consiste num sistema de bombagem, um injetor, as fases estacionária e móvel, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de recolha de dados (computador) (WHO, 2008).

O diagrama da Figura 5 representa os diferentes componentes de um sistema de HPLC.

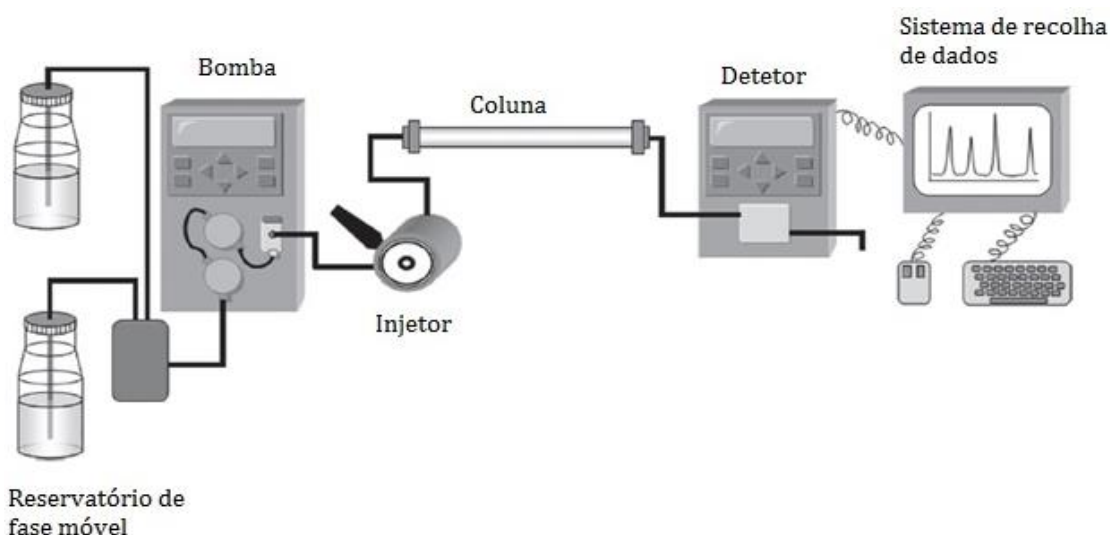


Figura 5 – Diagrama representativo dos diferentes componentes de um sistema de HPLC (adaptado de Nollet, 2013)

O sistema de bombagem proporciona um caudal controlado de fase móvel, a pressões elevadas, conduzindo-a à coluna cromatográfica. Este sistema permite, ainda, fixar ou variar a proporção dos componentes da fase móvel no decorrer da corrida cromatográfica, caso se pretenda uma eluição isocrática ou uma eluição em gradiente (Ball, 1988).

O sistema de injeção introduz uma quantidade exata da amostra, através de uma seringa de injeção automática, na fase móvel que a transporta até à coluna cromatográfica (Ball, 1988).

As diferentes interações dos componentes da amostra com a fase estacionária e com a fase móvel vão permitir a separação desses componentes. A maioria das separações são realizadas à temperatura ambiente, no entanto, alguns sistemas possuem estufas de modo a regular a temperatura a que ocorre a separação, com o objetivo de se conseguir uma melhor eficiência (Ball, 1988).

A deteção dos componentes separados é conseguida através de uma monitorização contínua do efluente que sai da coluna cromatográfica. Os compostos à medida que são eluídos da coluna passam por um detetor, que tem a sensibilidade para responder a alterações na concentração de todos os compostos de interesse. Os dois tipos de detetores mais utilizados são o detetor de absorção UV/Vis e o detetor de fluorescência, dependendo das características e concentrações dos analitos que são separados e analisados (Ball, 1988).

O sinal emitido pelo detetor é enviado para o dispositivo de recolha de dados (ex. computador), que é responsável pelo registo e processamento dos dados, resultando na criação de um cromatograma. A identificação e quantificação dos analitos são feitas através da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos respetivos picos com soluções padrão cujos tempos de retenção e concentrações são conhecidos (Waters, 2014)

3.5.1. Modos de Separação

A maior parte das separações são baseadas em mecanismos de partição, que se baseiam na polaridade dos analitos da amostra e na sua afinidade para com a fase móvel e estacionária (Skoog, 2007).

Em cromatografia de partição existem dois tipos de separação, consoante a natureza da fase móvel: separação em fase normal (NP-HPLC) e separação em fase inversa (RP-HPLC) (Nollet, 2013).

Na separação por NP-HPLC a fase estacionária utilizada possui uma polaridade mais elevada do que a fase móvel, fazendo com que os compostos com menor polaridade sejam os primeiros a ser eluídos da coluna (Nollet, 2013).

Em RP-HPLC utiliza-se um enchimento da coluna cuja partícula de sílica é quimicamente ligada com uma fase estacionária não polar; a fase móvel é um solvente com uma polaridade mais elevada do que a da fase estacionária. A ordem de eluição dos solutos é a oposta à ordem observada em NP-HPLC: os solutos polares são eluídos em primeiro lugar, pois têm uma maior afinidade com a fase móvel; os solutos não polares têm maior afinidade para com a fase estacionária, essencialmente hidrofóbica, e eluem depois (Ball, 1988).

O enchimento da coluna utilizado em RP-HPLC é geralmente baseado em partículas de sílica modificadas quimicamente, que facilita a ligação de cadeias de hidrocarbonetos, cujo número de átomos pode ir de C8-C18. O grupo funcional mais utilizado em RP-HPLC é o octadecil (C18). O uso de uma cadeia alquilo C18 assegura a retenção adequada do soluto; o tempo de retenção pode ser facilmente otimizado através do ajuste da composição da fase móvel (Ball, 1988; Nollet, 2013).

Comparado com outras formas de HPLC, a técnica de separação em fase inversa é geralmente mais robusta e versátil. As colunas de RP-HPLC são também mais eficientes e reprodutíveis e estão disponíveis numa gama mais ampla de opções que incluem as dimensões da coluna, tamanho da partícula e tipo de fase estacionária. A RP-HPLC é uma das técnicas mais difundidas devido à sua vasta aplicabilidade na separação de uma ampla gama de compostos (Layne, 2002; Snyder, 2010).

3.6. Validação de um Método Analítico

A validação de um método analítico, de acordo com a definição da norma ISO/IEC 17025 – Requerimentos gerais para Laboratórios de Ensaio e Calibração trata-se de uma confirmação, através do fornecimento de uma evidência objetiva, de que são cumpridos todos os requisitos específicos para a aplicação ou uso pretendido do método analítico (Internacional Standard Organization, 2005).

O principal objetivo da validação de um método analítico é garantir que todos os futuros ensaios de análises de rotina obtenham resultados suficientemente próximos do verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra a analisar (González, 2007).

Todo o processo de validação de um método analítico deve estar descrito num procedimento experimental e todas as determinações dos parâmetros de validação

devem ser realizadas em equipamentos e instrumentos que se encontrem dentro das especificações e em perfeito estado de funcionamento e calibração (Inmetro, 2011).

Os parâmetros necessários para a validação de um método analítico são os seguintes: gama de trabalho; linearidade; limite de deteção (LD); limite de quantificação (LQ); sensibilidade; precisão; exatidão; recuperação e incerteza dos resultados.

- Gama de trabalho

Para todos os métodos quantitativos existe uma gama de concentrações do analito, na qual o método pode ser aplicado. Dentro dessa gama de trabalho poderá existir uma gama de resposta linear, na qual haverá uma relação linear entre o sinal de resposta e a concentração do analito. A gama linear de trabalho é o intervalo entre os valores inferior e superior de concentração do analito, no qual foi demonstrado ser possível fazer a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (Inmetro, 2011).

Quando a metodologia utilizada envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho é avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. De acordo com a norma 8466-1, são analisadas, independentemente, dez réplicas dos padrões de concentração mais elevada e mais baixa, para verificar se existem diferenças significativas entre as suas variâncias (Relacre, 2000).

- Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade que um método tem de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito a analisar, dentro de uma determinada gama de trabalho (Ribani, 2004).

A sua quantificação requer que seja conhecida a relação entre a resposta medida e a concentração do analito. Pode ser obtida através de padrões internos ou externos e apresentada como uma expressão matemática usada para a determinação da concentração do analito presente na amostra. A equação da reta que relaciona essas duas variáveis está representada na equação (2):

$$y = ax + b \quad (2)$$

em que

y = resposta medida (absorvância, área ou altura do pico);

x = concentração;

a = declive da curva de calibração;

b = intersecção com o eixo y.

Segundo a norma ISO 8466-1, a linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico. Partindo-se de um conjunto de pares ordenados, calculam-se as funções de calibração linear e não linear, assim como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} (Relacre, 2000).

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela equação (3):

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (3)$$

em que N é o número de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste, PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (4)$$

Compara-se este valor de PG com o valor F da distribuição de Snedecor/Fisher tabelado:

- Se $PG \leq F$, a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$, a função de calibração é não linear.

○ Limite de Deteção

O limite de deteção (LD) corresponde ao mínimo teor medido, acima do qual é possível detetar a presença do analito a analisar, com uma certeza estatisticamente admissível. Este limite diz respeito à concentração mais baixa do analito que pode ser detetada numa amostra, mas pode não ser necessariamente quantificada como um valor exato (Relacre, 2000; Ribani, 2004).

O LD pode ser calculado através da relação sinal/ruído que é determinada através da comparação entre a medição dos sinais do analito na amostra em baixas concentrações conhecidas e um branco dessas amostras. A relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1, são as proporções geralmente aceites como estimativas do limite de deteção (Relacre, 2000; Ribani, 2004).

No geral, também se pode determinar o LD a partir da equação 5 (Relacre, 2000):

$$LD = x_0 + 3,3 \times s_0 \quad (5)$$

em que

x_0 – média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho

S_0 - desvio padrão associado a x_0

- Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) diz respeito à concentração mais baixa do analito que permite a sua quantificação, com uma determinada exatidão e precisão. Em termos práticos, corresponde geralmente ao padrão de calibração de concentração mais baixa (Relacre, 2000; Ribani, 2004).

Após a sua determinação, deve ser testado para averiguar se a precisão e exatidão conseguidas são satisfatórias.

Tal como o limite de deteção, o LQ também pode ser determinado através do método da relação sinal/ruído (cuja relação é, em geral, 10:1), e/ou através da equação (6) (Relacre, 2000):

$$LD = x_0 + 10 \times s_0 \quad (6)$$

em que

x_0 – média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho

S_0 - desvio padrão associado a x_0

- Sensibilidade

A sensibilidade é o parâmetro que avalia a capacidade que o método tem para diferenciar pequenas variações na concentração do analito a analisar. O método é mais sensível quanto maior for a variação na resposta resultante de pequenas variações de concentração do analito (Inmetro, 2011; Relacre, 2000).

Caso seja um método analítico de calibração linear, a sensibilidade do método corresponde ao declive da própria reta (Inmetro, 2011; Relacre, 2000).

A sensibilidade é um parâmetro bastante importante, pois pode avaliar-se a sua evolução ao longo do tempo; comparar o seu valor, para o mesmo analito ou para vários métodos analíticos; e comparar o seu valor para diferentes analitos (Inmetro, 2011; Relacre, 2000).

- Precisão

A precisão é um parâmetro que pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra ou amostras semelhantes (Relacre, 2000).

Essa dispersão pode ser avaliada através da repetibilidade e da precisão intermédia, as quais são normalmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (Inmetro, 2011; Relacre, 2000).

O coeficiente de variação (CV, expresso em %) também designado por desvio padrão relativo é calculado através da equação (7) e não deve ultrapassar os 15% (Inmetro, 2011; Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011).

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (7)$$

em que

s – desvio padrão

\bar{x} – concentração média determinada

- Repetibilidade

A repetibilidade diz respeito à precisão de ensaios realizados para uma mesma amostra, nas mesmas condições operacionais, ou seja, diz respeito à concordância dos resultados das várias medições de uma mesma amostra, sob condições idênticas. Essas condições dizem respeito a (Ribani, 2004; Inmetro, 2011):

- Mesmo procedimento experimental;
- Mesmo analista;
- Mesmo laboratório;
- Mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições;
- Repetições realizadas num curto espaço de tempo.

Para se determinar a repetibilidade de um método efetuam-se várias medições sobre uma mesma amostra, nas condições de repetibilidade mencionadas anteriormente. A estimativa da variação (S^2_r) de um método de análise é determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas mesmas condições. Uma vez que a repetibilidade pode variar com o teor do analito a analisar, em princípio esta última condição assegura a igualdade estatística das variações de w séries de análises. Portanto, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível i de concentração é calculada através da equação (8) (Relacre, 2000):

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad (8)$$

em que

S_{ri}^2 – variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

S_{wi}^2 - variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$(n_{wi} - 1)$ – grau de liberdade da série de análises;

p – número de laboratórios participantes.

O coeficiente de variação, expresso em percentagem, pode ser calculado através da equação (9):

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (9)$$

em que

S_{ri} – desvio padrão dos valores de concentração das tomas analisadas em condições de repetibilidade;

\bar{x} – média dos valores de concentração obtidos.

- Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, com a utilização do mesmo método, mesmo laboratório, mas, no entanto, com condições pré-definidas a variar, sendo estas:

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes dias de análise;
- Com/sem verificação da calibração.

Este parâmetro é o mais representativo da variabilidade dos resultados de um laboratório e como tal, o parâmetro mais aconselhável a adotar. O objetivo da sua validação é assegurar que o método dará os mesmos resultados, no mesmo laboratório (Ribani, 2004).

A sua determinação e controlo podem ser feitos através de vários métodos, dependendo do ensaio e tipo de aplicação. Um deles passa pela utilização da seguinte expressão (10) (Inmetro, 2011):

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (10)$$

em que

$Spi_{(j,k)}$ - desvio padrão de precisão intermédia

t – total de amostras ensaiadas

n – total de ensaios efetuados por amostra;

j – nº da amostra, $j = 1, t$

k – nº do ensaio da amostra j, $k = 1, n$

y_{jk} – valor do resultado k para a amostra j

\bar{y}_j – média aritmética dos resultados da amostra j.

O coeficiente de variação da precisão intermédia, expresso em percentagem, pode ser calculado através da equação (11):

$$CV_r = \frac{Sp_i(j,k)}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

em que

S_ri – desvio padrão da precisão intermédia;

\bar{x} – média dos valores de concentração obtidos.

o Exatidão

A exatidão indica a proximidade entre o resultado da análise de uma amostra e o seu valor de referência, aceite como sendo verdadeiro.

A avaliação da exatidão pode ser feita através de (Relacre, 2000):

- o Materiais de referência certificados;
- o Ensaio interlaboratoriais;
- o Testes comparativos.

Os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método analítico sempre que possível. Vêm acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de um dado analito e uma incerteza associada. São fornecidos por organismos reconhecidos e credíveis como por exemplo NIST (*National Institute of Standards and Technology*) ou FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) (Ribani, 2004).

O valor obtido na análise de um MRC é comparado com o valor certificado, sendo determinados o erro e a exatidão da análise. Nessa comparação podem ser utilizados vários critérios de decisão, nomeadamente, o erro relativo, testes de hipóteses (teste t), fator de desempenho z (*z-score*), erro normalizado (Relacre, 2000).

Caso se recorra ao cálculo do fator de desempenho z, que é também uma forma mais corrente de avaliar o desempenho do laboratório em ensaios interlaboratoriais, este pode ser feito através da equação (12):

$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (12)$$

em que

X_{lab} – valor obtido pelo laboratório;

X_v – valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC);

s – desvio-padrão dos resultados dos ensaios realizados.

A avaliação poderá ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação:

$|z| \leq 2$ - resultado Satisfatório;

$2 < |z| \leq 3$ – resultado Questionável;

$|z| > 3$ – resultado insatisfatório;

o Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada através da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, sendo que essas quantidades podem ser próximas da concentração máxima permitida, do LQ ou da concentração intermédia da gama de trabalho do método e é calculada segundo a equação (13) (Inmetro, 2011):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (13)$$

em que

C_1 – concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 – concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 – concentração do analito adicionada.

- Incerteza dos Resultados

Segundo o Guia ISO/IEC 99:2008 a incerteza é um “parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas” (Guia ISO/IEC 99, 2008).

O “Guia para a Quantificação de Incerteza em ensaios químicos” permite calcular a incerteza dos resultados segundo três abordagens diferentes: a abordagem “passo a passo”, abordagem baseada em dados de ensaios interlaboratoriais e abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade (IPAC, 2007).

A aplicação desta última abordagem consiste na combinação das incertezas determinadas para a precisão e exatidão do método analítico (IPAC, 2007).

- Quantificação da incerteza associada à precisão

A avaliação da incerteza associada à precisão deve ser feita em condições de precisão intermédia, em vez de condições de repetibilidade, de forma a refletir eventuais variações do método que, normalmente, seriam constantes num mesmo dia de trabalho. A incerteza associada à precisão ($u'_{precisão}$) pode ser determinada através da equação (14) (IPAC, 2007):

$$u'_{precisão} = \frac{Spi_{(j,k)}}{\bar{x}} \quad (14)$$

em que

$Spi_{(j,k)}$ - desvio padrão de precisão intermédia obtido a partir da equação 10

\bar{x} – média da concentração determinada

- Quantificação da incerteza associada à exatidão

A quantificação da incerteza associada à exatidão está relacionada com o erro sistemático do ensaio. Este erro pode ser estimado através de alguns itens de referência, tais como, materiais de referência certificados, amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência.

Quando a determinação da exatidão é feita através de MRC, é possível estimar a recuperação média do método através da equação (15) (IPAC, 2007):

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{c}_{obs}}{c_{MRC}} \quad (15)$$

em que

\bar{c}_{obs} – concentração média de uma série de análises do MRC

c_{MRC} – valor certificado do MRC

A incerteza associada à exatidão, $(u(\bar{R}_m))$, pode ser determinada através da equação (16):

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{c}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{MRC})}{c_{MRC}}\right)^2} \quad (16)$$

em que

s_{obs} – desvio padrão da série de análises do MRC

n – número de análises do MRC

$u(c_{MRC})$ – incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC (referenciada no certificado do MRC)

Os valores obtidos para as incertezas associadas à precisão e à exatidão podem ser combinados de modo a determinar-se a incerteza combinada expandida, através da equação (17) (IPAC, 2007):

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{precisão})^2 + (u(\bar{R}_m))^2} \quad (17)$$

em que

$u(y)$ – incerteza combinada expandida relativa

y – fator de expansão igual a 2, para um intervalo de confiança de 95%. Quando a precisão e a exatidão são estimadas através de um número reduzido de ensaios (inferior a 6), utiliza-se um fator de expansão extraído de uma tabela *t-student* bilateral para um nível de confiança igual a 95% e um número de graus de liberdade igual ao menor número de ensaios menos 1.

3.7. Material de referência interno

A aplicação do HPLC à determinação de carotenoides é morosa, tem custos relativamente elevados e é propensa a erros, devido à grande variabilidade, e instabilidade destes compostos e à sua difícil extração. Assim, com vista a minimizar estes erros, uma solução poderia passar pela utilização frequente de um MRC. No entanto, como a aquisição frequente deste material apresenta custos muito elevados, as despesas com as análises iriam aumentar significativamente.

O interesse pelo desenvolvimento de um material de referência interno resulta do facto da sua utilização poder vir a permitir reduzir custos diminuindo a frequência da utilização do material de referência certificado e a introduzir um melhor controlo dos resultados obtidos, já que desde há 4 anos não há ensaios interlaboratoriais para estes analitos. Poderá ainda contribuir para reduzir o número de injeções por replicado de amostra e eventualmente o número de replicados por amostra conduzindo, assim, a uma redução no consumo de fase móvel.

Normalmente, e apesar de todos os cuidados, os materiais preparados em laboratório nunca são completamente homogéneos. Quando esse material é dividido em pequenas sub-amostras, existem normalmente pequenas variações na sua composição. Em condições normais essas variações podem ser desprezadas, mas é necessário comprovar esse facto. Ao testar a homogeneidade do material, procura-se provar que as variações existentes entre essas sub-amostras não são diferentes das variações existentes entre replicados.

Para comprovar a homogeneidade do material interno de referência desenvolvido, é possível seguir-se o procedimento descrito por Fearn (2001). Os resultados obtidos são analisados estatisticamente recorrendo ao teste de Cochran, que permite verificar a existência de *outliers*, e ao teste de análise de variâncias que permite avaliar os desvios analíticos e de amostragem. Para aplicação destes testes é necessário um número mínimo de catorze valores experimentais.

O teste de Cochran permite verificar se existem *outliers*, ou seja, valores que sejam discrepantes no conjunto de resultados obtidos.

Neste teste, o valor observado, C , é calculado através da equação (18),

$$C = \frac{D_{\text{máx}}^2}{\sum D_i^2} \quad (18)$$

em que

D_i – diferença entre cada par de duplicados para $i=1, \dots, m$, com m = número de sub-amostras

Se o valor obtido através do teste de Cochran for inferior ao valor crítico (obtido a partir da Tabela A2.1 que consta no anexo 2), é possível dizer que não existe qualquer evidência da existência de *outliers*.

No teste para aceitação da variância entre sub-amostras, é calculado um valor crítico para comparação, sendo que este é obtido a partir do cálculo dos valores de variância permitida entre sub-amostras (σ_{all}^2), da variância analítica (S_{an}^2) e de fatores (F_1 e F_2) obtidos a partir da Tabela A3.1 que consta no anexo 3. O procedimento adotado teve por base os seguintes passos:

- i) Cálculo da variância analítica, S_{an}^2

$$S_{an}^2 = \frac{\sum D_i^2}{2m} \quad (19)$$

- ii) Cálculo da estimativa da variância entre as sub-amostras, S_{sam}^2

$$S_{sam}^2 = \frac{\left(\frac{vs}{2}\right) - S_{an}^2}{2} \quad (20)$$

em que

vs – variância da soma de cada par de duplicados

- iii) Determinação da variância admissível entre as sub-amostras, σ_{all}^2

$$\sigma_{all}^2 = (0,3 \times \sigma_p)^2 \quad (21)$$

em que

σ_p – desvio padrão alvo, tendo sido atribuído o valor de 10% da média do teor obtido para cada analito

iv) Determinação do valor crítico, C

$$c = F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times S_{sam}^2 \quad (22)$$

em que

F_1 e F_2 são valores tabelados (Tabela A3.1 do anexo 3).

Se a variância entre sub-amostras for inferior ao valor crítico, significa que o material desenvolvido é suficientemente homogéneo.

4. Materiais e Métodos

O laboratório de Química do INSA utiliza um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação dos teores de carotenoides em frutos e produtos hortícolas acreditado pela norma ISO EN 17025 cujo procedimento foi validado internamente (Dias, 2008). Neste trabalho contribuiu-se para a extensão da validação deste método à determinação da vitamina A e da vitamina E, desenvolveu-se um material de referência interno e avaliou-se os teores de carotenoides e vitaminas A e E em algumas amostras recolhidas no âmbito do projeto *TDSExposure*.

Os analitos (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, vitamina A e vitamina E) presentes nas várias amostras foram extraídos da matriz com THF e MeOH. Os extratos obtidos de matrizes que continham ésteres dos carotenoides, vitamina A e vitamina E sofreram saponificação para a obtenção destes compostos na forma livre. A separação e a análise dos compostos foram feitas através de um método de HPLC de fase inversa, com deteção por UV/Vis a um comprimento de onda de 325 nm para a vitamina A, 473 nm para o licopeno e 450 nm para os restantes carotenoides. Para a vitamina E a deteção foi realizada por fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 295 nm e de emissão de 330 nm. A identificação dos analitos foi efetuada por comparação com os tempos de retenção dos respetivos padrões. Na quantificação recorreu-se ao método do padrão externo e utilizando também padrão interno (equinenona e β -apo-8'-carotenal).

4.1. Reagentes e Padrões

Nas análises, foi utilizada água com uma pureza de, pelo menos, grau II, obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore).

Os reagentes utilizados foram os seguintes:

- Acetato de amónio, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, p.a., pureza $\geq 98,0\%$, Merck
- Acetonitrilo (ACN), CH_3CN , para HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, Merck
- Azoto, N_2 , com mínimo de pureza 99,9990%
- Carbonato de magnésio básico, $4\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck
- Diclorometano (DCM), CH_2Cl_2 , para HPLC, pureza $\geq 99,8\%$, Merck
- Etanol (EtOH), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, p.a., pureza $\geq 99,9\%$, Merck
- Éter de petróleo, p.a., ponto de ebulição 40-60°C, CAS 64749-49-0, Merck
- Hexano, C_6H_{14} , p.a., pureza $\geq 99,0\%$, Merck

- Hidróxido de potássio, KOH, lentilhas, p.a., pureza $\geq 85,0\%$, CAS 1310-58-3, Prolabo VWR
- Hidroxitolueno butilado (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol) (BHT), $C_{15}H_{24}O$, p.a., pureza $\geq 98,0\%$, Panreac
- Metanol (MeOH), CH_3OH , p.a., pureza $\geq 99,8\%$, Prolabo VWR
- Metanol (MeOH), CH_3OH , para HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, Prolabo VWR, CAS 67-56-1
- Pirogalol (1,2,3-tri-hidroxibenzeno), $C_6H_6O_3$, p.a., Merck
- Sulfato de sódio anidro, Na_2SO_4 , p.a., pureza $\geq 99\%$, Merck
- Tetrahidrofurano (THF), C_4H_8O , p.a., pureza $\geq 99,9\%$, Prolabo VWR
- Trietilamina (TEA), $C_6H_{15}N$, p.a., pureza $\geq 99\%$, Merck

Os padrões (substâncias puras) utilizados foram os seguintes:

- α -caroteno, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, CaroteNature
- β -caroteno, pureza (HPLC) $\geq 96\%$, Sigma
- β -criptoxantina, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, CaroteNature
- Licopeno, pureza (HPLC) $\geq 95\%$, Sigma
- Luteína, pureza (HPLC) $\geq 96\%$, Sigma
- Zeaxantina, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, CaroteNature
- β -apo-8'-carotenal, pureza (HPLC) $\geq 97\%$, Sigma
- Equinenona, pureza (HPLC) $\geq 98\%$, CaroteNature
- Vitamina A (all-*trans*-retinol), $C_{20}H_{30}O$, sintético (HPLC), $\geq 95\%$, Sigma
- Vitamina E (dl- α -Tocoferol), $C_{29}H_{50}O_2$, sintético (HPLC), $\geq 95\%$, Sigma

4.2. Equipamento

O equipamento necessário para a realização deste trabalho foi o seguinte:

- Agitador vai-vem horizontal, marca Qlabo, modelo KS-15.
- Aparelho de ultra-sons, marca Branson (*ultrasonic cleaner*), modelo Branson 3510 com controlo de tempo e de temperatura.
- Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo XP 205, com precisão de 0,0001 g.
- Bloco de evaporação seco, marca Büchi Vacuum, modelo B-721.

- Câmara fria a temperatura de 5 °C, ensaiada com registador de temperatura LT172 associado a Pt100's, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a 5°C e critério de aceitação ± 3 °C.
- Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5804R.
- Coluna analítica Vydac (cat. No. 201TP54) de fase invertida contendo sílica polimericamente modificada com C18, 250 x 4,6 mm (tamanho de partícula 5 μm , diâmetro de poro 300 Å, carga de carbono 8%).
- Coluna analítica Waters Spherisorb ODS2 revestida com PEEK (Alltech, cat. No. 8161), 100 x 4,6 mm (tamanho da partícula 5 μm , diâmetro do poro 80 Å, carga de carbono 12% carbono).
- Equipamento de HPLC marca Waters, modelo 717 plus, com detetor de rede de díodos (DAD), marca Waters, modelo 2998, detetor de fluorescência marca Waters, modelo 474. Foi utilizado o *software* Empower[®] como sistema de tratamento de dados.
- Espectrofotómetro, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer equipado com o *software* VISIOpro[®].
- Evaporador rotativo, marca Büchi, modelo R-210, com ligação ao azoto, com banho de água (*heating bath* B-491) e regulador de temperatura e unidade de vácuo (*vacuum controler* V-850).
- Frigorífico de 4 °C, marca Miele.
- Homogeneizador, marca yellowline, modelo DI25 basic.
- Moinho de facas (Grindomix), marca: Retsch, modelos GM 200 e GM 300.
- Placa de agitação eletromagnética, marca IKA Labortechnik, modelo RCT basic.
- Sistema de ultrapurificação de água, modelo Milli-Q, marca Millipore.
- Ultracongelador a temperatura de -70°C, marca Revco, ensaiado com registador de temperatura LT211 associado a termopares, rastreado à Fluke (EUA), de acordo com ensaio realizado a -70 °C e critério de aceitação ≤ -70 °C.

4.3. Preparação de soluções

4.3.1. Soluções de trabalho e fase móvel

- THF:MeOH (1:1) com 0,1% de BHT

Mediu-se numa proveta 1 L de THF e 1 L de MeOH, e juntou-se num frasco âmbar. Adicionou-se 2 g de BHT e agitou-se a solução numa placa eletromagnética, utilizando um agitador magnético, até dissolução completa.

- Éter de petróleo com 0,1% de BHT

Num frasco âmbar dissolveu-se cerca de 1 g de BHT em 1 L de éter de petróleo. Agitou-se numa placa eletromagnética, utilizando um agitador magnético, até dissolução completa.

- DCM com 0,1% de BHT

Dissolveu-se 0,1 g de BHT em DCM e diluiu-se a 100 mL num balão volumétrico.

- Solução de hidróxido de potássio, a 10% em MeOH

Pesou-se aproximadamente 2 g de hidróxido de potássio num balão volumétrico de 20 mL. Em seguida, adicionou-se 3 mL de água desionizada e perfez-se com MeOH.

- Solução de pirogalol em MeOH

Pesou-se 80 mg de pirogalol para um balão de 20 mL, dissolveu-se e perfez-se o volume com MeOH.

- Fase móvel para HPLC

Dissolveu-se aproximadamente 7,7 g de acetato de amónio em 2 L de MeOH numa placa de agitação eletromagnética. Em seguida, adicionou-se 500 mL de DCM, 5 mL de TEA e 10 g de BHT. Voltou-se a agitar a solução.

Filtrou-se através de um filtro de membrana de 0,45 μm , apropriado para solventes orgânicos. Desgaseificou-se, durante aproximadamente 15 minutos, no banho de ultra-sons.

- Solução de reconstituição

Mediu-se 670 mL de ACN e 230 mL de MeOH, para um frasco âmbar. Adicionou-se 0,9 g de BHT e levou-se a agitar. Filtrou-se através de um filtro de membrana de 0,45 μm , apropriado para solventes orgânicos.

4.3.2. Soluções de padrões externos

- Soluções mãe individuais de cada carotenoide

Dissolveu-se o conteúdo da ampola de cada carotenoide (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) em DCM com 0,1% de BHT. Para ampolas de 1 mg utilizaram-se balões volumétricos de 10 mL e para ampolas de 5 mg usaram-se balões volumétricos de 50 mL.

- Solução mãe de all-*trans* retinol (Vitamina A)

Dissolveu-se, num balão volumétrico de 100 mL, uma ampola de all-*trans*-retinol (25 mg) em EtOH, adicionou-se 0,1% de BHT e completou-se o volume.

- Solução mãe de dl- α -tocoferol (Vitamina E)

Pesou-se cerca de 10 mg de dl- α -tocoferol, numa balança analítica, e dissolveu-se em MeOH, num balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume.

- Soluções padrão para confirmação do teor

Carotenoides

Mediu-se 0,2 mL da solução mãe de cada carotenoide para diferentes balões volumétricos de 10 mL. Evaporou-se o solvente com azoto. Para α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina e licopeno reconstituiu-se em 10 mL de hexano; para a luteína e zeaxantina reconstituiu-se em 10 mL de EtOH.

Vitamina A

Num balão volumétrico de 50 mL, diluiu-se 0,7 mL da solução mãe em EtOH.

Vitamina E

Num balão volumétrico de 50 mL, diluiu-se 25 mL da solução em MeOH.

Em seguida, procedeu-se à medida da absorvância das soluções no espectrofotómetro em células de quartzo de 1 cm de percurso ótico e aos valores de comprimento de onda referidos na Tabela 4.

O teor dos padrões foi calculado recorrendo à Lei de Lambert-Beer, através da equação (23):

$$C_p = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} \quad (23)$$

em que

C_p é o teor do padrão em $\mu\text{g/mL}$

A é a absorvância

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção ou coeficiente de absorção (absorvância de uma solução com um teor de 1 g/100 mL medida numa célula de percurso ótico - 1 cm)

Tabela 4 - Coeficientes de extinção dos carotenoides (adaptado de documentação do DAN, 2012)

	Solvente	λ (nm)	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$
α -caroteno	Hexano	444	2800
β -caroteno	Hexano	450	2560
β -criptoxantina	Hexano	451	2460
licopeno	Hexano	472	3450
luteína	Etanol	445	2550
zeaxantina	Etanol	450	2540
all- <i>trans</i> -retinol	Etanol	325	1830
dl- α -tocoferol	Metanol	292	76

- Soluções padrão de cada carotenoide para determinação por HPLC da pureza

Para a preparação de soluções padrão de cada carotenoide, para avaliação da pureza pipetou-se 0,2 mL de cada uma das soluções mãe para 6 balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com solução de reconstituição.

- Soluções padrão de calibração

Carotenoides

Prepararam-se seis soluções padrão de trabalho, sendo cada uma constituída pela mistura dos diferentes padrões. As diluições foram feitas de acordo com a Tabela 5 e completou-se o volume com solução de reconstituição. A determinação da concentração de cada padrão presente em cada solução de trabalho teve em conta a sua pureza, sendo o seu valor de 1 para o α -caroteno, 0,8528 para o β -caroteno, 0,9783 para a β -criptoxantina, 0,6247 para o licopeno, 0,9161 para a luteína e 1 para a zeaxantina.

Tabela 5 - Constituição das soluções padrão de trabalho para os carotenoides e respetiva concentração

Nível sol. Padrão	1	2	3	4	5	6
Sol. Mãe (mL)	-	0,25	0,20	0,30	0,40	0,50
Sol. Padrão Nível 6 (mL)	0,25	-	-	-	-	-
Volume final (mL)	10	25	10	10	10	10
Teor de α -caroteno ($\mu\text{g/mL}$)	0,1	0,8	1,6	2,4	3,3	4,1
Teor de β -caroteno ($\mu\text{g/mL}$)	0,1	0,7	1,5	2,2	3,0	3,7
Teor de β -criptoxantina ($\mu\text{g/mL}$)	0,2	1,2	2,5	3,7	5,0	6,2
Teor de licopeno ($\mu\text{g/mL}$)	0,03	0,4	0,8	1,1	1,5	1,9
Teor de luteína ($\mu\text{g/mL}$)	0,1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4
Teor de zeaxantina ($\mu\text{g/mL}$)	0,1	1,0	2,1	3,1	4,2	5,2

Vitamina A

Diluiu-se 1 mL da solução mãe em *n*-heptano, usando um balão volumétrico de 10 mL.

Vitamina E

Transferiu-se 20 mL da solução padrão para confirmação do teor para um balão de evaporador rotativo de 50 mL e evaporou-se a uma temperatura máxima de 40°C. Reconstitui-se com 20 mL de *n*-heptano.

Em seguida, as soluções de vitamina A e E, assim preparadas, foram diluídas de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 – Constituição das soluções padrão de calibração para a Vitamina A e Vitamina E e respetiva concentração

Nível de sol. Padrão	1	2	3	4	5	6
Sol. Calibração all- <i>trans</i> retinol (mL)	1,2	2,3	2,4	3,0	3,8	4,2
Sol. Calibração dl- α -tocoferol (mL)	1,0	3,8	5,0	7,0	9,0	11,0
Volume final (mL)	20	25	20	20	20	20
Teor de Vitamina A ($\mu\text{g/mL}$)	0,9	1,4	1,9	2,3	2,9	3,3
Teor de vitamina E ($\mu\text{g/mL}$)	2,4	7,1	11,7	16,3	21,0	25,7

4.3.3. Soluções de padrões internos

- β -apo-8'-carotenal

Pesou-se 2 mg de padrão para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a solução de DCM contendo 0,1% de BHT.

- Equinenona

Pesou-se 2 mg de padrão para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se com a solução de DCM contendo 0,1% de BHT.

4.4. Amostras

Neste trabalho foram utilizadas amostras compostas recolhidas no âmbito do projeto *TDSExposure*, constituídas a partir de alimentos que estão disponíveis no mercado português, nomeadamente frutos (laranja, maçã, morango, pera, pêssago/ananas, figo), salada de frutas, leguminosas (favas, ervilhas, grão e

tremoços), néctar, sumo, amendoins, batata, carne de vaca, salmão, salgados, empadão, ovos, cereais, marmelada, pipocas, pão-de-ló e pastéis de nata. As amostras foram adquiridas em hipermercados, supermercados, mercados, lojas específicas (ex. padarias, talhos) e restaurantes da região da grande Lisboa.

4.4.1. Preparação das amostras

Cada amostra composta foi preparada a partir de 12 sub-amostras adquiridas/preparadas de forma a obter uma amostra representativa do consumo dos alimentos em análise, de acordo com o procedimento estabelecido no projeto *TDSExposure*. A título de exemplo uma amostra composta de maçã contém diferentes variedades de maçã (*golden*, *royal gala*, *starking*) adquiridas em 12 locais diferentes (grandes superfícies, supermercados, mercados) da região de Lisboa de forma a mimetizar o consumo de maçã pela população desta região. As amostras sólidas foram trituradas/homogeneizadas no moinho. As amostras líquidas foram homogeneizadas com agitação suave.

4.4.1.1. Extração

Pesou-se cada amostra em duplicado, num erlenmeyer de 100 mL. A massa de amostra variou de 2 a 20 g, de acordo com os teores esperados para os analitos.

Adicionou-se 1 g de carbonato de magnésio e 50 mL da mistura de THF e MeOH. Juntou-se também 0,2 mL de solução de padrão interno (equinenona nas amostras de favas e ervilhas ou β -apo-8'-carotenal nas restantes).

O padrão interno foi também analisado separadamente na mesma concentração em que foi adicionado às amostras.

A extração dos analitos da matriz foi feita recorrendo-se ao homogeneizador a 19000 rpm durante 1 min. Lavou-se o homogeneizador e o erlenmeyer com mais 50 mL da mistura THF:MeOH.

De seguida, filtrou-se a suspensão através de um filtro de fibra de vidro, utilizando um *Kitasato* sob vácuo e o respetivo funil de *Büchner*. Lavou-se o bolo de filtração com mais 2x50 mL da mistura THF:MeOH.

Depois, procedeu-se a uma extração líquido-líquido, onde ocorreu a passagem dos analitos para um outro solvente, éter de petróleo.

Transferiram-se os extratos combinados para uma pera de evaporação e levou-se ao evaporador rotativo para evaporar o restante líquido remanescente.

Reconstituiu-se em 5,0 mL da solução de reconstituição.

Filtrou-se com filtros de seringa de 0,45 μm apropriados para os solventes utilizados e transferiu-se para frascinhos adequados para análise no HPLC.

4.4.1.2. Saponificação

Transferiu-se 2 mL da solução resultante obtida através da extração dos carotenoides para tubos de vidro roscado e evaporou-se até à secura, utilizando-se o bloco de evaporação.

Em seguida, adicionou-se 0,75 mL de solução de pirogalol e depois 0,75 mL de solução de KOH. Purgou-se o ar do interior dos tubos com azoto, e misturou-se num vórtex até dissolução completa do resíduo.

Procedeu-se à agitação dos tubos num agitador vai-vém horizontal, a 250 rpm durante 1 a 3 h, conforme o tipo de amostra a analisar.

Após o período de agitação, adicionou-se 1,5 mL de água, purgou-se com azoto e misturou-se com um vórtex. Adicionou-se, em seguida, 3 mL de éter de petróleo e purgou-se com azoto.

Recorreu-se, novamente, ao agitador durante 5 minutos, a 250 rpm, e em seguida procedeu-se à centrifugação durante 2 minutos a 2000 rpm.

A fase etérea foi transferida com uma pipeta de *Pasteur* para um tubo de vidro limpo. A extração com éter de petróleo foi repetida mais duas vezes.

As fases etéreas foram transferidas para o bloco de evaporação de modo a evaporar o solvente. Em seguida, procedeu-se à reconstituição em 2,0 mL da solução de reconstituição.

A solução foi transferida com pipeta de *Pasteur* para frascinhos de vidro apropriados para a análise no HPLC.

4.4.2. Análise cromatográfica

4.4.2.1. Condições cromatográficas

As condições utilizadas na análise cromatográfica por HPLC foram as seguintes:

- Caudal: 1,5 mL/min.
- Fase móvel (gradiente de acordo com a Tabela 7): Eluente A – ACN; Eluente B – MeOH (contendo acetato de amónio 0,05M):DCM, 20:5 (v/v), contendo 0,4% de BHT e 0,2% de TEA.

- Fase estacionária: Waters Spherisorb ODS2 revestida com PEEK (Alltech, cat. No. 8161), 100 x 4,6 mm (tamanho da partícula 5 μm , diâmetro do poro 80 \AA , carga de carbono 12% carbono) ligada a uma coluna de fase invertida Vydac (cat. No. 201TP54), contendo sílica polimericamente modificada com C18, 250 x 4,6 mm (tamanho de partícula 5 μm , diâmetro de poro 300 \AA , carga de carbono 8%).
- Volume de injeção: 50 μL .
- Tempo de corrida: aproximadamente 35 minutos.
- Detecção de fluorescência: 295 nm para vitamina E.
- Detecção UV/Vis: 325 nm para a vitamina A, 473 nm para o licopeno e 450 nm para os restantes carotenoides.

Tabela 7 – Condições aplicadas na eluição em gradiente

Tempo (min)	%Eluente A	%Eluente B
0	67	33
14	67	33
17	75	25
30	75	25
33	72	28
34,5	67	33

Na análise dos cromatogramas com vista à identificação e quantificação dos analitos recorreu-se ao *software* “Empower” integrado no sistema de HPLC “Waters”.

4.4.2.2. Identificação dos analitos

Todos os analitos foram identificados pela comparação dos seus tempos de retenção com os dos padrões. A identidade de cada analito foi também confirmada por comparação do seu espectro na amostra e no padrão.

4.4.2.3. Quantificação do teor dos analitos

A quantificação dos analitos foi efetuada a partir das áreas dos respetivos picos utilizando as curvas de calibração construídas para o efeito.

O *software* “Empower” integrado no sistema de HPLC “Waters” permite o cálculo dos teores dos três analitos na amostra, utilizando as curvas de calibração construídas para o efeito.

O teor dos carotenoides nas amostras, C , em mg/100 g, é calculado recorrendo à equação (24):

$$C = 10 \times \frac{C_{si} \times V_f}{m \times R \times d} \quad (24)$$

em que

10 é um fator de conversão de unidades.

C_{si} é o teor do analito na solução de amostra analisada no cromatógrafo ($\mu\text{g/mL}$).

V_f é o volume final em que se reconstitui a amostra (mL).

m é a massa da toma de amostra (g).

R é a recuperação do padrão interno (%).

d é a diluição efetuada na solução de amostra após reconstituição da amostra.

De modo a avaliar se existem perdas significativas de analito durante a análise foi determinada a recuperação do padrão interno (R), a qual foi calculada para cada amostra através da razão entre as áreas dos picos do padrão interno na solução de padrão interno e na solução de amostra. O padrão foi usado em igual concentração nas duas soluções.

Os cálculos das concentrações da vitamina A em $\mu\text{g}/100$ g de amostra e da vitamina E em mg/100 g foram efetuados através das equações 25 e 26, respetivamente.

$$C_{vitA} = 100 \times \frac{C_{si} \times V_r}{m \times d} \quad (25)$$

$$C_{vitE} = 0,1 \times \frac{C_{si} \times V_r}{m \times d} \quad (26)$$

em que

C_{vitA} – Concentração final de vitamina A na amostra ($\mu\text{g}/100$ g).

C_{vitE} – Concentração final da vitamina E na amostra (mg/100 g).

C_{si} – Concentração da solução analisada no cromatógrafo ($\mu\text{g/mL}$).

V_r – Volume em que a toma de amostra foi reconstituída (mL).

m – massa da toma de amostra (g).

d – diluição efetuada na solução para análise.

4.5. Etapas de validação do método

Neste trabalho foram analisados e validados alguns dos parâmetros referidos anteriormente, com o objetivo de estender o método já validado à determinação da vitamina A e vitamina E. Em seguida são apresentados os parâmetros que foram validados e o respetivo procedimento. Na determinação dos parâmetros foram usadas folhas de cálculo que se encontram implementadas no DAN.

Linearidade – A linearidade do método foi avaliada através da análise de dez curvas de calibração. Após efetuada a regressão linear, foi realizado o teste de Mandel e analisado o coeficiente de determinação e os resíduos obtidos.

Limites analíticos da curva de calibração (LQ e LD) – Os limites analíticos de quantificação (LQ) e de deteção (LD) foram determinados através do desvio padrão das concentrações do primeiro padrão de dez curvas de calibração.

Sensibilidade – Para a avaliação da sensibilidade foi determinado o desvio padrão e o CV dos valores de declive de dez equações de calibração obtidas.

Repetibilidade – Para a determinação do CV da repetibilidade para a análise da vitamina A foram realizados dois ensaios em quatro amostras (pastéis de nata, pão-de-ló, ovos e NIST 2383) sob condições de repetibilidade. Para a vitamina E foram realizados dois ensaios em duas amostras (uvas e NIST 2383).

Precisão intermédia – Para a determinação do CV da precisão intermédia foram realizados, em dias diferentes, dois ensaios em duas amostras, ovos e NIST 2383 para a vitamina A e uvas e NIST 2383 para a vitamina E.

Exatidão – A exatidão do método foi avaliada através da análise de um material de referência certificado, NIST 2383, contendo os analitos em questão (vitamina A e vitamina E).

4.6. Preparação do material de referência interno

Depois de estudadas diversas matrizes alimentares, optou-se por preparar o material de referência interno a partir da mistura de uma refeição em boião à base de cenoura e brócolos, com polpa de tomate e pêsego em calda. De seguida, procedeu-se à homogeneização da mistura a uma velocidade de 3500 rpm, durante 1 minuto, com inversão de sentido aos 30 segundos, recorrendo ao moinho Retsch Grindomix GM-300.

Para avaliar a homogeneidade do material de referência procedeu-se à sua divisão em doze sub-amostras, com uma massa, aproximadamente, de 2,5 g, conforme ilustra a Figura 6. Essas sub-amostras foram analisadas aleatoriamente em dois dias diferentes e em duplicado, aplicando o procedimento descrito anteriormente (4.4.1.1 e 4.4.1.2).

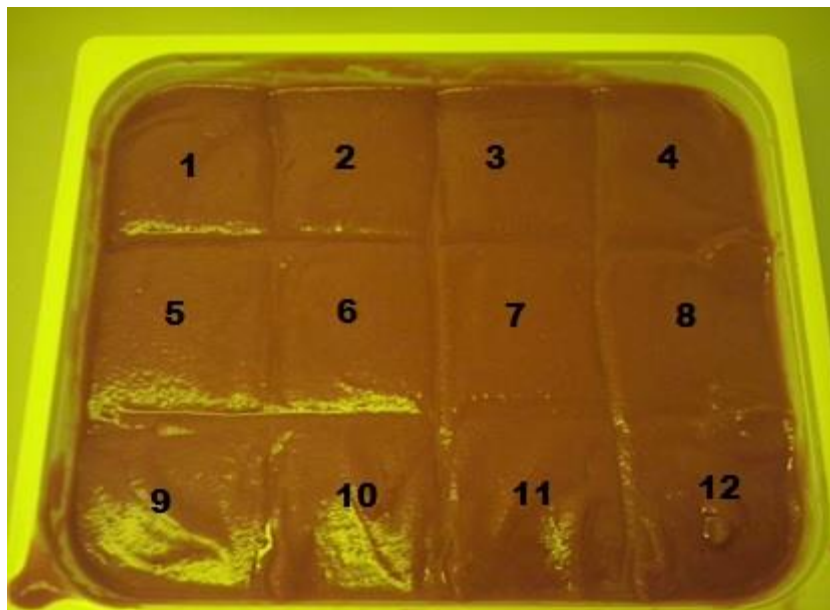


Figura 6 – Material de referência interno

5. Resultados e Discussão

Este trabalho iniciou-se com uma pesquisa na literatura sobre os carotenoides, no âmbito do projeto *Ibercarot*. Essa pesquisa permitiu a recolha de dados, num total de 33 artigos, relativos a 143 alimentos, pratos compostos, frutos e produtos hortícolas produzidos em diferentes países ibero-americanos. Todos os artigos que fazem parte desta base de dados foram publicados entre 1998 a 2014.

O método de quantificação utilizado em todas as determinações de carotenoides presentes nos alimentos que constam da base de dados foi o HPLC, sendo variável a utilização ou não do passo de saponificação no procedimento experimental de extração dos analitos das amostras.

A criação desta base de dados teve como principal objetivo a recolha de informação referente aos teores dos seis principais carotenoides presentes nos alimentos (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina). No entanto, também foram incluídos na base de dados outros carotenoides que, eventualmente, tenham sido quantificados pelos autores.

A base de dados que foi construída encontra-se no anexo 4.

Após a criação desta base de dados procedeu-se à revisão bibliográfica sobre o método analítico (anexo 1) tendo-se chegado à conclusão que os métodos utilizados no que se refere à extração da amostra e à identificação e quantificação por HPLC continuam a ser os mais utilizados.

Em seguida procedeu-se ao desenvolvimento de um material de referência interno, à extensão da gama de aplicação do método acreditado para a determinação de carotenoides, à determinação das vitaminas A e E e à análise destes analitos em amostras do projeto *TDSExposure*.

5.1. Desenvolvimento de um material de referência interno para otimização do método acreditado para a determinação de carotenoides em frutos e produtos hortícolas

O desenvolvimento deste material de referência interno começou com o estudo de matrizes alimentares representativas de frutos e produtos hortícolas que pudessem constituir a mistura de interesse. Em primeiro lugar foram analisados boiões de refeições preparadas para crianças, uma vez que estes produtos apresentam um maior controlo na sua preparação, de que resulta uma composição mais homogénea

e eventualmente uma melhor conservação ao longo do tempo. Foram também feitas análises a outros alimentos que, de acordo com a pesquisa bibliográfica, complementariam a composição destas refeições, de modo a obter-se um material com os seis carotenoides em teores convenientes para o método analítico.

Os teores de carotenoides foram obtidos após o procedimento laboratorial para determinação de carotenoides recorrendo a folhas de cálculo que se encontram validadas (anexo 5) e utilizando retas de calibração construídas para os vários carotenoides (anexo 6), em que as concentrações das soluções padrão foram corrigidas com base nas medidas de absorvância feitas para cada analito.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores obtidos do teor de carotenoides para as diferentes amostras analisadas em duplicado.

Tabela 8 - Teores dos carotenoides presentes nas amostras analisadas

Amostras	Teores carotenoides determinados laboratorialmente (mg/100 g)					
	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina
Boião 1	0,38	0,44	ND	1,7	0,035	0,013
Boião 2	1,2	4,3	ND	ND	0,32	ND
Sumo Concentrado	0,0059	0,0095	0,021	ND	0,014	0,027
Sumo Polpa Marca 1	0,012	0,027	0,027	ND	0,021	0,018
Sumo Polpa Marca 2	0,0088	0,015	0,020	ND	0,021	0,044
Sumo Natural	0,0042	0,0081	0,016	ND	0,016	0,037
Pêssego em calda	ND	0,20	0,17	ND	0,0096	0,033
Polpa Tomate	ND	0,25	ND	5,9	0,035	0,066

ND- Não detetado (limites de deteção em mg/100 g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, β -criptoxantina-0,0006, licopeno-0,0008, luteína- 0,0007 e zeaxantina-0,0008)

Após a análise dos teores dos carotenoides obtidos para as amostras, concluiu-se que o material de referência interno seria então constituído por refeição do boião 1, à base de cenoura e brócolos, por polpa de tomate e por pêssego em calda, uma vez que a mistura permitia uma representação significativa dos seis carotenoides. Na Tabela 9 encontra-se descrita a composição do material de referência.

Tabela 9 – Composição do material de referência interno

Quantidade de Boião 1 (%)	Quantidade de Polpa de tomate (%)	Quantidade de Pêssego em calda (%)	Quantidade total de amostra composta (Kg)
20	40	40	2

Na Figura 7 apresenta-se um cromatograma relativo à análise do material de referência interno desenvolvido contendo os seis carotenoides analisados.

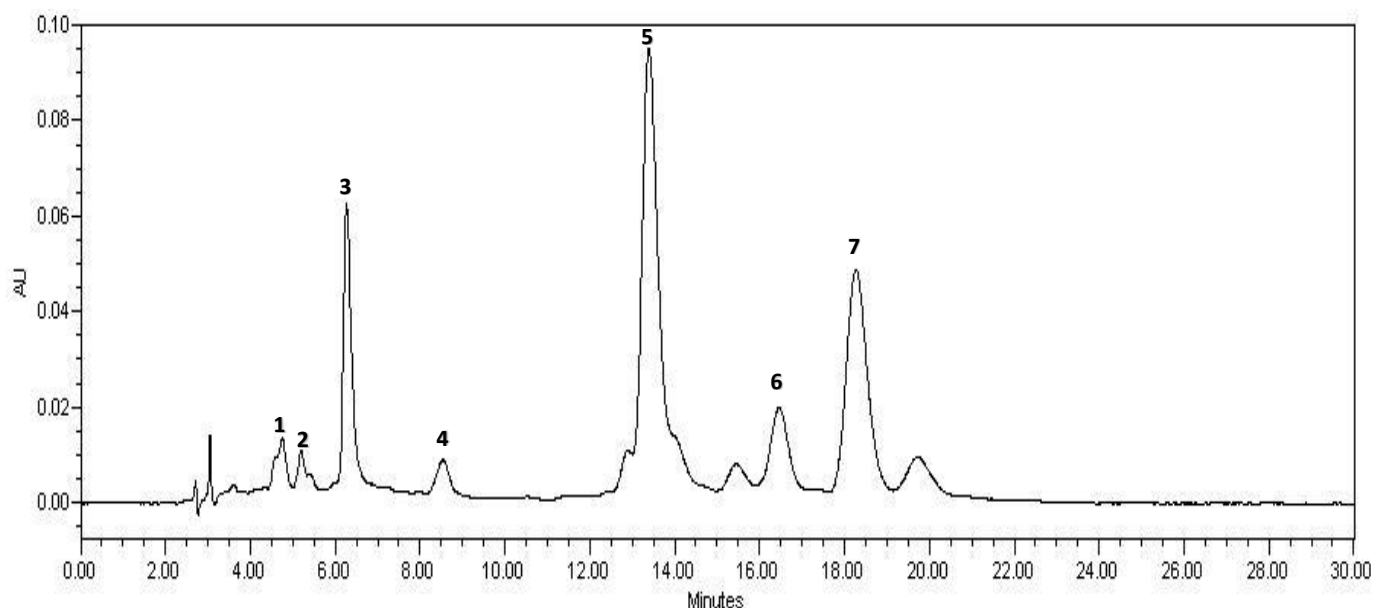


Figura 7 - Cromatograma do material de referência interno contendo 1 - luteína (tr=4,771 min), 2- zeaxantina (tr=5,220 min), 3 – β -apo-8'-carotenal (tr= 6, 333 min), 4 – β -criptoxantina (tr=8,558 min), 5 - licopeno (tr=13,431 min), 6 – α -caroteno (tr=16,406 min) e 7- β -caroteno (tr=18,213 min)

Na Tabela 10, apresentam-se os valores médios dos teores obtidos para os carotenoides nas doze sub-amostras, as quais foram analisadas em duplicado.

Tabela 10 - Teor em carotenoides nas amostras analisadas

Sub-amostra	Teores carotenoides determinados laboratorialmente (mg/100 g)					
	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	licopeno	Luteína	zeaxantina
1	0,24	0,63	0,11	1,2	0,057	0,036
2	0,19	0,63	0,11	1,2	0,057	0,036
3	0,23	0,71	0,12	1,2	0,040	0,042
4	0,21	0,66	0,11	1,3	0,052	0,037
5	0,36	0,72	0,15	4,3	0,049	0,045
6	0,22	0,67	0,13	2,3	0,043	0,040
7	0,25	0,83	0,13	1,8	0,049	0,040
8	0,24	0,59	0,13	0,76	0,052	0,046
9	0,23	0,76	0,11	2,2	0,074	0,041
10	0,21	0,72	0,12	2,4	0,064	0,041
11	0,23	0,75	0,11	1,9	0,055	0,041
12	0,22	0,67	0,11	0,82	0,039	0,042
Média	0,22	0,69	0,12	1,7	0,051	0,041

Quando este material é dividido em pequenas sub-amostras, existem normalmente pequenas variações na sua composição, sendo necessário comprovar que podem ser desprezadas. Ao testar a homogeneidade do material, procura-se provar que as variações existentes entre essas sub-amostras não são diferentes das variações existentes entre replicados.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente recorrendo ao teste de Cochran (ver 3.7), que permite verificar se existem *outliers*, ou seja, valores que sejam discrepantes no conjunto de resultados obtidos.

O valor crítico foi obtido através da Tabela A2.1, que se encontra no anexo 2, tendo em atenção o número de ensaios realizados.

Na Tabela 11 apresentam-se os valores observados para cada carotenoide em estudo e os respetivos valores críticos que se encontram tabelados.

Tabela 11 – Resultados do Teste de Cochran

Analito	Valor observado	Valor crítico
α -caroteno	0,388	0,540
β -caroteno	0,430	0,540
β -criptoxantina	0,378	0,540
licopeno	0,578	0,540
luteína	0,312	0,540
zeaxantina	0,473	0,540

Da comparação entre o valor observado e o respetivo valor crítico tabelado (Tabela 11) conclui-se que os resultados para o licopeno em duas sub-amostras seriam *outliers* e deveriam ser desprezados. De facto, se esses resultados não forem considerados, o valor observado para o licopeno será de 0,040, sendo possível dizer que passou a não existir nenhuma evidência da existência de *outliers*.

Recorreu-se também ao teste de análise de variâncias, que permitiu avaliar os desvios analíticos e de amostragem.

Na Tabela 12 apresentam-se os valores obtidos para as variâncias entre sub-amostras, para cada analito, e os respetivos valores críticos que se encontram tabelados (anexo 3).

Tabela 12 – Teste de análise de variâncias

	Variância entre sub-amostras	Valor Crítico
α -caroteno	0,0144	0,0282
β -caroteno	0,210	0,490
β -criptoxantina	0,00340	0,00886
licopeno	17,20	18,70
luteína	0,00917	0,00186
zeaxantina	0,000631	0,000934

Para cada analito, a estimativa da variância entre sub-amostras foi comparada com o respetivo valor crítico, calculado a partir da variância analítica e da variância entre sub-amostras admissível.

Como se pode verificar pela análise dos valores obtidos, apenas a variância entre sub-amostras para a luteína é superior ao valor crítico. Como tal, foram desprezados seis pontos num total de vinte e quatro. Após se ter desprezado esses valores, a variância entre sub-amostras para a luteína foi de 0,000854, sendo inferior ao valor crítico (0,00122).

Isto significa que não existem evidências de que a variância obtida para as sub-amostras do material em estudo fosse superior à variância associada à precisão/repetibilidade do método analítico, ou seja, o processo de homogeneização utilizado permitiu obter um material suficientemente homogéneo para os diferentes analitos analisados.

Considerando que se o material de referência interno for liofilizado é mais fácil de armazenar e conservar, foram também realizadas análises, em duplicado, no mesmo material depois de este ter sofrido liofilização.

Com base nas massas do material, antes e pós liofilização determinou-se a humidade do material em estudo, a qual foi de 85,7%.

Os teores médios obtidos para cada analito no material de referência interno expressos em termos de matéria seca (ms), encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Teor médio dos carotenoides (mg/100 g ms) no material de referência interno liofilizado e fresco

Analito	Teor em carotenoides (mg/100 g ms)	
	Material liofilizado	Material fresco
α -caroteno	1,9	1,6
β -caroteno	6,0	4,9
β -criptoxantina	0,87	0,84
licopeno	13	13
luteína	0,21	0,37
zeaxantina	0,43	0,28

Para verificar se os valores obtidos para o material liofilizado eram semelhantes aos valores obtidos para o material fresco, procedeu-se à realização de um teste t, com um nível de significância de 5%.

Os valores de p para os seis analitos encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de p para os carotenoides

Analito	p
α -caroteno	0,1147
β -caroteno	0,1242
β -criptoxantina	0,6802
licopeno	0,7197
luteína	0,0345
zeaxantina	0,0679

Considerando os valores de p apresentados na Tabela 14, verifica-se que, com exceção da luteína, é possível concluir que não houve degradação pela liofilização, uma vez que estes valores determinados antes e após a liofilização não são estatisticamente diferentes. No caso da luteína, o facto dos valores obtidos não serem estatisticamente iguais poderá indicar que não houve uma boa separação da luteína e zeaxantina, uma vez que ao somar os seus teores, tanto no material liofilizado como no material fresco, verificamos que o resultado é semelhante. Eventualmente também poderá ter ocorrido uma degradação/isomerização da luteína que tenha contribuído para este resultado.

5.2. Validação do método para a determinação das vitaminas A e E (Extensão do método acreditado para os carotenoides)

Com o objetivo de estender a validação do método já acreditado para os carotenoides, à determinação da vitamina A e da vitamina E, foram avaliados os parâmetros de validação de acordo com os procedimentos já referidos em 4.5 e que a seguir se descrevem com maior detalhe.

- Gama de trabalho e linearidade da curva de calibração

Tendo como base a gama de trabalho utilizada no método analítico, já validado no DAN, para a determinação das vitaminas A e E, estudou-se a linearidade entre a resposta do equipamento (medida através da área do pico) e o teor de vitamina A e vitamina E entre 0,9 µg/mL e 3,3 µg/mL para a vitamina A e entre 2,4 µg/mL e 25,7 µg/mL para a vitamina E.

Na Tabela 15, apresentam-se as concentrações de vitamina A e vitamina E nas soluções padrão necessárias à construção das curvas de calibração, as quais foram preparadas a partir de soluções padrão mãe (Tabela 6).

Tabela 15 – Concentrações de vitamina A e vitamina E nas soluções padrão de calibração

Teor de Vitamina A (µg/mL)	0,9	1,4	1,9	2,3	2,9	3,3
Teor de vitamina E (µg/mL)	2,4	7,1	11,7	16,3	21,0	25,7

Nas Figuras 8 e 9 estão apresentadas as curvas de calibração para as vitaminas A e E, respetivamente, tendo em conta a gama de trabalho referida anteriormente.

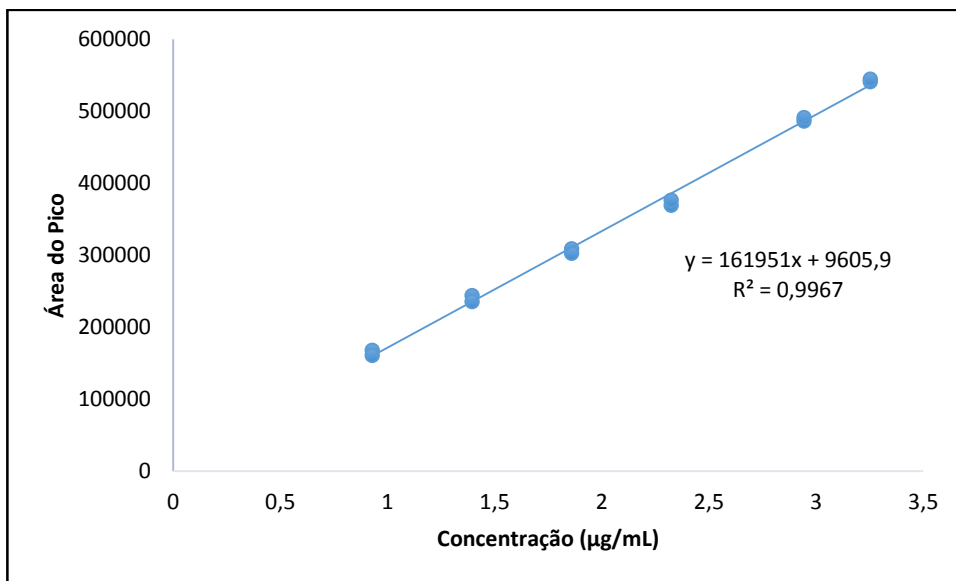


Figura 8 – Reta de calibração para a determinação da Vitamina A

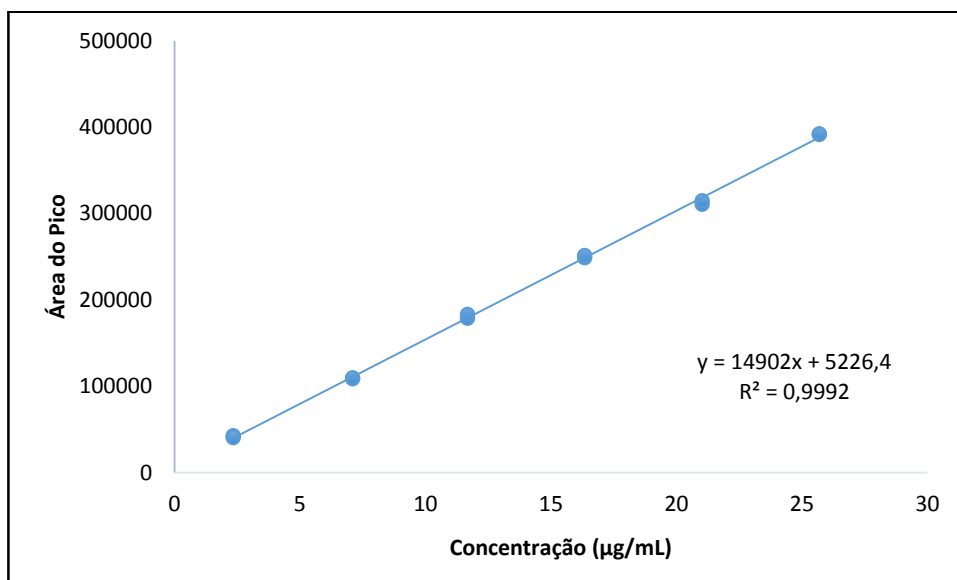


Figura 9 – Reta de calibração para a determinação da vitamina E

A partir dos resultados obtidos foi realizada uma comparação entre o modelo linear e o modelo polinomial para verificar qual o ajuste mais adequado. Aplicou-se o teste de Mandel que, através da equação (4), permitiu calcular os valores de PG para as duas curvas de calibração. Os valores de PG para as vitaminas A e E foram -8,99 e -9,00, respetivamente.

Por comparação dos valores de PG calculados com o valor tabelado de F. de *Snedecor/Fisher* para n-3 graus de liberdade, 10,56, é possível concluir que o ajuste linear é adequado aos pontos experimentais, uma vez que os valores de PG que foram obtidos são inferiores a F.

A linearidade das curvas de calibração também foi confirmada através da análise do coeficiente de determinação (r^2), 0,9967 e 0,9992 para a vitamina A e para a vitamina E, respetivamente, e dos resíduos gerados para cada padrão da curva de calibração. Uma vez que o valor deste coeficiente é superior a 0,995 para as duas vitaminas e que visualizando os gráficos não se observam desvios em relação à reta traçada, pode-se afirmar que a resposta do equipamento ao teor de vitamina A e vitamina E na solução é linear.

Por outro lado, nas Figuras 10 e 11 estão representados os gráficos dos resíduos percentuais gerados para cada padrão da curva de calibração da vitamina A e da vitamina E, respetivamente. Os resíduos representam o desvio percentual entre o valor da área do pico (intensidade do sinal), para os diferentes pontos da curva e o valor resultante do ajuste linear. Como se verifica, todos os resíduos se encontram abaixo dos 10%, estando, portanto, de acordo com o critério de aceitação definido pelo controlo de qualidade interno do INSA (DAN, 2012).

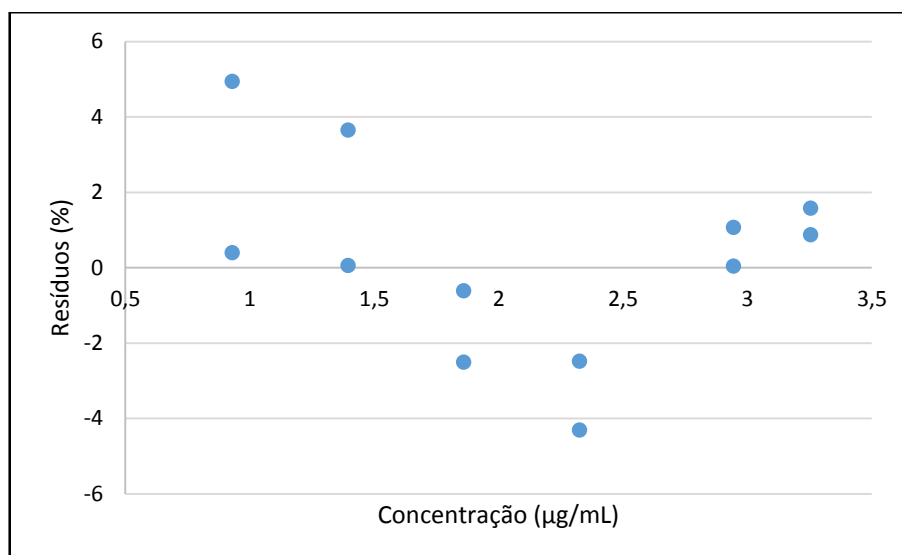


Figura 10 – Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da vitamina A

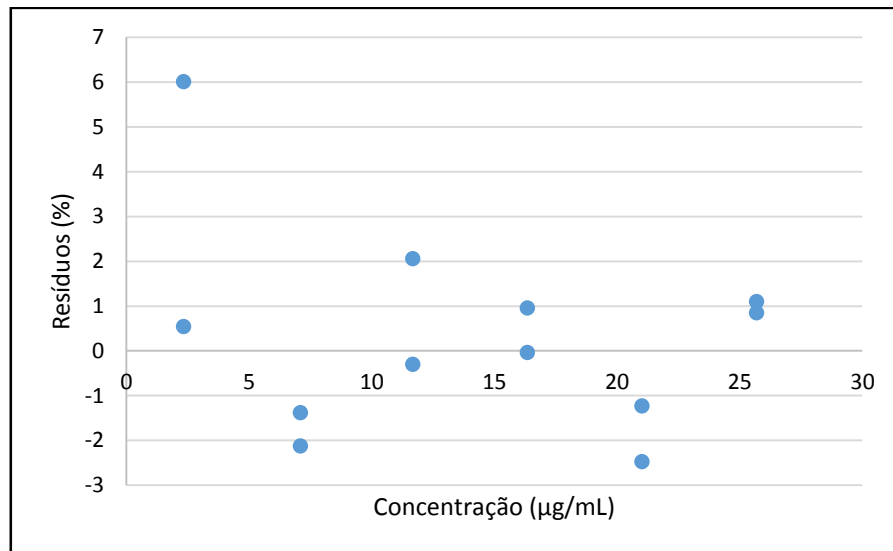


Figura 11 - Resíduos para os diferentes pontos da reta de calibração da vitamina E

Em anexo encontram-se o relatório completo obtido através do programa EMPOWER (anexo 7) e exemplo das folhas de cálculo internas do DAN utilizadas para a obtenção destes resultados (anexo 8).

- Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de deteção e quantificação para as vitaminas A e E, foram calculados com base no desvio padrão das concentrações do primeiro padrão de dez curvas de calibração, de acordo com as equações (5) e (6).

Na Tabela 16, encontram-se os valores obtidos para os limites de deteção e quantificação para as vitaminas A e E.

Tabela 16 – Limites de deteção e quantificação para a vitamina A e vitamina E

	Vitamina A	Vitamina E
Limite de Detecção (µg/mL)	0,065	0,78
Limite de Quantificação (µg/mL)	0,20	2,4

- Sensibilidade

A avaliação da sensibilidade do método foi feita através da análise dos valores do declive de dez curvas de calibração preparadas ao longo do tempo para a vitamina A e vitamina E. Na Tabela 17 encontram-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação dos vários declives obtidos.

Tabela 17 - Sensibilidade do método, desvio padrão e coeficiente de variação (CV)

	Vitamina A	Vitamina E
Sensibilidade	170600	16150
Desvio Padrão	4903,5	1493,9
CV (%)	2,9	9,3

Através dos valores obtidos verifica-se que, para a vitamina A, a sensibilidade do método se manteve aproximadamente constante durante a realização de todos os ensaios realizados, uma vez que se obteve o coeficiente de variação relativamente baixo. Para a vitamina E o coeficiente de variação obtido é mais elevado, indicando que a sensibilidade do método sofreu algumas variações ao longo da realização de todos os ensaios. Comparando os resultados obtidos o método é bastante mais sensível para a vitamina A do que para a vitamina E.

- Precisão

A precisão foi avaliada através da análise dos parâmetros repetibilidade e precisão intermédia, cujos cálculos foram efetuados recorrendo às folhas de cálculo apresentadas no anexo 9. Para a vitamina A, foram avaliadas quatro amostras diferentes, nomeadamente pastéis de nata, pão-de-ló, ovos e NIST 2383. Para a vitamina E foram avaliadas o NIST 2383 e uvas.

A utilização neste ensaio de um material de referência certificado como o NIST 2383 está relacionada com o facto de ser constituído por uma mistura de matrizes alimentares, sendo útil em estudos de precisão.

Na determinação dos parâmetros de precisão para a vitamina E não foi possível utilizar mais amostras do projeto *TDSE* devido a problemas de funcionamento na lâmpada do detetor de fluorescência que não se conseguiram resolver em tempo útil.

Repetibilidade

Para a vitamina A, a repetibilidade do método foi avaliada através da análise dos duplicados de cinco amostras diferentes (carne de vaca, pastéis de nata, pão-de-ló, ovos e NIST 2383), mantendo todas as outras condições operatórias constantes, nomeadamente o mesmo equipamento, o mesmo analista, seguindo o mesmo procedimento experimental.

No caso da vitamina E, o estudo deste parâmetro foi realizado através da análise das duas amostras diferentes (NIST 2383 e uvas), em duplicado, com as mesmas condições operatórias que o estudo da repetibilidade para vitamina A.

O coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r) para as vitaminas A e E foram calculados através da equação (9).

Precisão Intermédia

Para a vitamina A, os estudos de precisão intermédia foram realizados com o objetivo de avaliar a variabilidade dos resultados obtidos, através da análise, em duplicado, de duas amostras diferentes (ovos e NIST 2383), variando o dia da sua análise, mas mantendo constante as restantes condições operatórias.

No caso da vitamina E, a precisão intermédia foi avaliada através da análise de duas amostras diferentes, em duplicado, (NIST 2383 e uvas), realizada, também, em dias diferentes.

Assim como a repetibilidade, também a precisão intermédia pode ser expressa através do coeficiente de variação de precisão intermédia, calculado pela equação (11).

Na Tabela 18 apresentam-se os valores dos coeficientes de variação da repetibilidade (CV_r) e da precisão intermédia (CV_R).

Tabela 18 – Coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia

	Vitamina A	Vitamina E
CV_r (%)	11,4	10,0
CV_R (%)	14,4	10,3

Os coeficientes de variação obtidos para a repetibilidade e precisão intermédia foram inferiores a 15% (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011), sendo possível afirmar que o método apresenta uma boa repetibilidade e precisão intermédia para as matrizes estudadas.

- Exatidão

A exatidão deste método analítico foi avaliada através da quantificação da vitamina A e vitamina E numa amostra de material de referência certificado (MRC), o NIST 2383, que apresentava um teor de vitamina A de 0,08 mg/100 g e de vitamina E de 2,5 mg/100 g.

O MRC foi analisado segundo o procedimento descrito anteriormente, e foram realizadas, em duplicado, quatro análises em dias diferentes.

A avaliação deste parâmetro foi feita através do cálculo de z-score, segundo a equação (12) de acordo com a qual se o módulo do valor obtido for igual ou inferior a 2 o resultado será satisfatório, confirmando-se a exatidão do método.

O teor médio obtido para as duas vitaminas no MRC e os respetivos valores de z-score são apresentados na Tabela 19. Todos os valores de z-score obtidos, tanto para a vitamina A como para a vitamina E, são em módulo inferiores a 2, sendo por isso considerados resultados satisfatórios, podendo afirmar-se que o método é exato para a determinação das vitaminas A e E.

Tabela 19 – Teores de vitamina A e de vitamina E e respetivos z-score

Dia da análise	Vitamina A		Vitamina E	
	Teor de Vitamina A determinado laboratorialmente (mg/100g)	Z	Teor de Vitamina E determinado laboratorialmente (mg/100g)	Z
Dia 1	0,046	1,2	2,25	0,30
Dia 2	0,077	0,12	2,2	0,35
Dia 3	0,10	0,83	2,2	0,38
Dia 4	0,11	1,2	1,8	0,87

Os resultados de validação obtidos para as vitaminas A e E são indicativos de que é possível determinar estes analitos utilizando este método. Será, no entanto, necessário estudar mais matrizes para obter uma validação mais completa.

- Incerteza dos resultados obtidos

Em relação aos carotenoides, tratando-se de um método previamente acreditado as incertezas tinham sido previamente avaliadas recorrendo a várias matrizes de frutos e produtos hortícolas. A incerteza expandida relativa combinada foi

de aproximadamente 30% para o α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, 45% para a luteína e zeaxantina e 60% para o licopeno.

Neste trabalho, o cálculo das incertezas, para as vitaminas A e E, foi realizado seguindo uma abordagem com base nos dados da validação do método, recorrendo aos valores de precisão intermédia e exatidão determinados previamente e utilizando as equações (14) e (16), anexo 10.

A incerteza expandida relativa combinada foi de 30% para a vitamina E e de 40% para a vitamina A (*all-trans*-retinol), conduzindo, em geral, à apresentação dos resultados com dois algarismos significativos, tal como são apresentados os teores em carotenoides.

Os valores de incerteza obtidos para a vitamina A e E são semelhantes aos determinados para estes analitos pelo método acreditado no INSA, baseado nas normas EN ISO 12822 e 12823-1, que são 32% e 40% para as vitamina E e A, respetivamente.

5.3. Análise de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina), vitamina A e vitamina E em amostras do projeto *TDSExposure*

No âmbito do projeto *TDSExposure* e de acordo com as amostras recolhidas/preparadas durante o período em que decorreu este trabalho, foram analisadas diferentes amostras de variadas matrizes alimentares.

Todas as amostras foram processadas e analisadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente e os resultados finais foram obtidos através de cálculos efetuados utilizando folhas de cálculo como as apresentadas nos anexos 5 e 11.

Todos os resultados obtidos foram corrigidos com base na recuperação do padrão interno (β -apo-8'-carotenal ou equinenona, conforme os casos) obtida em cada ensaio. As recuperações obtidas para os analitos quantificados após saponificação (40%-60%) são em geral bastante inferiores às obtidas para os analitos que não requerem saponificação (60%-120%).

Carotenoides

Na Figura 12, a título exemplificativo, apresenta-se um cromatograma relativo à análise da amostra de salada de frutas contendo os seis carotenoides analisados.

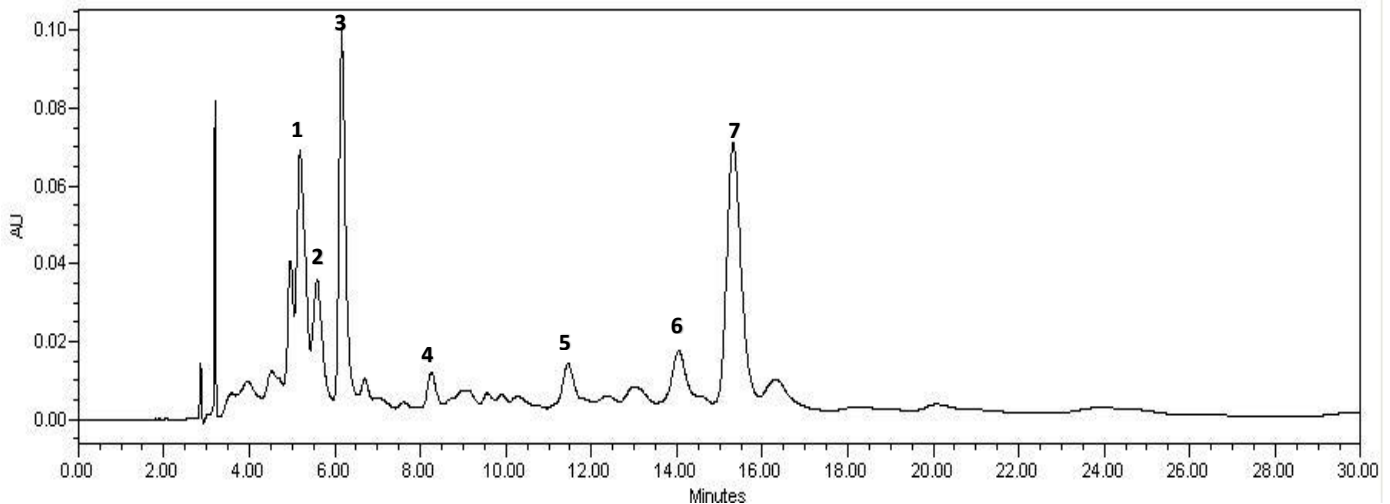


Figura 12 - Cromatograma da amostra de salada de frutas contendo 1 - luteína (tr=5,102 min), 2- zeaxantina (tr=5,694 min), 3 – β -apo-8'-carotenal (tr= 6, 066 min), 4 – β -criptoxantina (tr=8,120 min), 5 - licopeno (tr=11,252 min), 6 – α -caroteno (tr=13,856 min) e 7- β -caroteno (tr=15,067 min)

Na Tabela 20, apresentam-se os valores médios do teor em carotenoides obtidos para cada amostra analisada em duplicado, os quais são afetados pelas incertezas referidas no ponto 5.3.

Tabela 20 – Teores dos carotenoides presentes nas amostras analisadas

Amostras	Teores de carotenoides determinados laboratorialmente (mg/100 g)					
	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina
Laranja	ND	0,060	0,056	ND	0,024	0,055
Maçã	ND	0,022	0,0038	ND	0,0067	0,0058
Morango	ND	0,0091	ND	ND	0,030	0,0083
Pera	ND	(0,0016) ^a	ND	ND	0,0098	0,0063
Pêssego/Ananás	ND	0,20	0,17	ND	0,0096	0,033
Figo	ND	0,019	ND	ND	0,022	0,040
Salada de Frutas	0,019	0,089	0,013	0,014	0,033	0,020
Néctar	ND	0,11	0,012	(0,0019) ^a	0,0056	0,014
Sumo	0,0067	0,019	0,016	ND	0,0099	0,027
Favas	ND	0,10	ND	ND	1,1	0,10
Ervilhas	ND	0,35	ND	ND	0,81	ND
Grão	ND	ND	ND	ND	0,13	0,18
Tremoços	ND	ND	ND	ND	0,022	0,12
Amendoins	ND	ND	ND	ND	0,054	ND
Batata	ND	0,0052	ND	ND	0,027	0,018
Carne Vaca	ND	0,014	ND	ND	0,0057	0,027
Salmão	ND	ND	ND	ND	0,087	0,15
Salgados	0,040	ND	ND	ND	0,064	ND
Empadão	ND	0,056	ND	0,31	0,096	0,026
Ovos	ND	ND	ND	ND	0,27	ND
Cereais	ND	0,063	0,010	ND	0,069	0,077
Marmelada	ND	0,024	0,020	ND	0,010	0,016
Pipocas	ND	0,0096	0,012	ND	0,10	0,17
Pão-de-ló	ND	0,022	0,0023	ND	0,25	0,26
Pasteis Nata	ND	0,028	ND	ND	0,087	ND

ND- Não detetado (limites de deteção em mg/100 g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, β -criptoxantina-0,0006, licopeno-0,0008, luteína- 0,0007 e zeaxantina-0,0008)

(^a) – Entre o limite de deteção e o limite de quantificação (limites de quantificação em mg/100 g: α -caroteno-0,002, β -caroteno-0,003, β -criptoxantina-0,002, licopeno-0,003, luteína- 0,002, e zeaxantina-0,002)

Com base na análise dos resultados obtidos para todas as amostras analisadas é possível verificar que os carotenoides presentes na maior parte das matrizes alimentares, e consequentemente presentes na alimentação dos portugueses, são a luteína, zeaxantina e β -caroteno, sendo que a luteína é o único carotenoide que está presente em todas as amostras analisadas. A única amostra em que foi possível identificar e quantificar todos os carotenoides analisados foi a salada de frutas.

Em relação aos teores mais elevados de cada carotenoide, a amostra de salgados foi a que apresentou maior teor de α -caroteno, das três amostras em que foi detetado este composto; o β -caroteno apresentou um teor mais elevado na amostra de ervilhas; a amostra composta de pêsego/ananás foi a que apresentou um teor mais elevado de β -criptoxantina; no caso do licopeno o teor mais elevado encontra-se na amostra de empadão; a luteína encontra-se em maior quantidade na amostra de favas; e por fim a zeaxantina apresenta maior teor na amostra de pão-de-ló.

Procedendo agora a uma discussão mais pormenorizada por grupo de alimentos, a Figura 13 apresenta os teores em carotenoides e respetiva incerteza para os frutos analisados neste trabalho sob a forma de um gráfico de barras, para facilitar comparações.

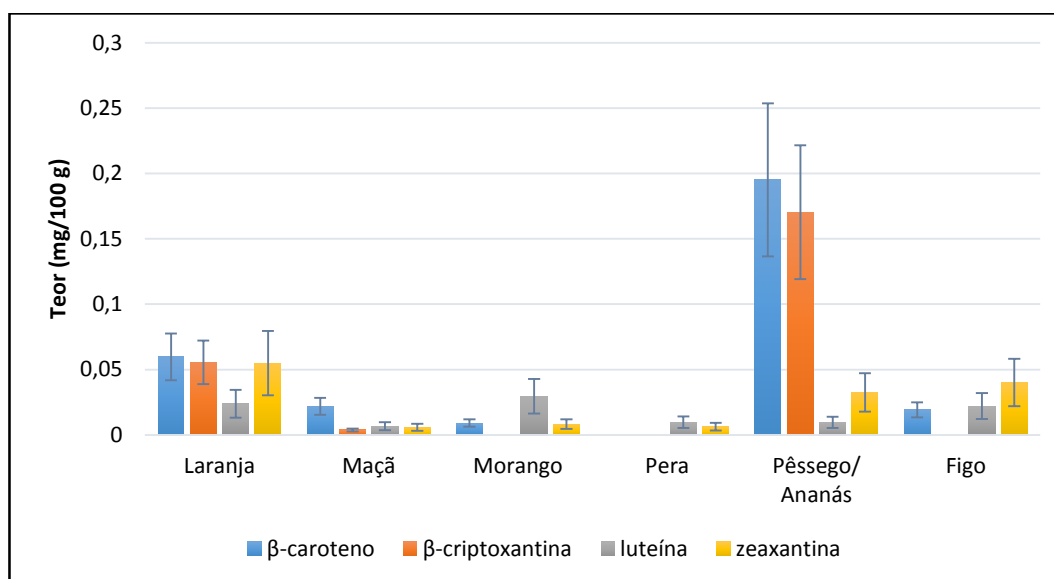


Figura 13 – Teores dos carotenoides e respetiva incerteza nos frutos analisados

Com a análise efetuada às seis amostras de frutos foi possível identificar e quantificar quatro carotenoides: o β -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína e a zeaxantina. No caso da pera foi possível identificar β -caroteno, mas o seu teor encontrava-se abaixo do limite de quantificação.

Através da observação do gráfico de barras é possível verificar que a luteína e a zeaxantina são os carotenoides que se encontram presentes em todos os frutos analisados. Só a laranja, maçã e pêsego/ananás apresentaram β -criptoxantina.

A amostra composta por pêsego e ananás foi a que apresentou os teores de β -caroteno e β -criptoxantina mais elevados.

No caso da zeaxantina, foi a laranja que apresentou um maior teor enquanto em relação à luteína, o morango foi a amostra que apresentou teores mais elevados.

Uma comparação com os resultados obtidos por outros autores é apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 – Teores de carotenoides em frutas (mg/100 g)

Frutos	Referências	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina
Laranja	Este trabalho	-	0,060	0,056	-	0,024	0,05
	Murillo et al. (2010)	-	-	-	-	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
	Dias et al. (2009)	0,011 a 0,027	0,017 a 0,049	0,11 a 0,23	-	0,034 a 0,072	0,066 a 0,19
Maçã	Este trabalho	ND	0,022	0,0038	-	0,0067	0,0058
	Dias et al. (2009)	-	0,010 a 0,063	0,004	-	0,0032 a 0,017	0,0030
Morango	Este trabalho	-	0,0091	-	-	0,030	0,0083
	Cardoso et al. (2011)	-	0,0541 \pm 0,00771 ^a - 0,0530 \pm 0,00215 ^b	-	-	-	-
Pera	Este trabalho	-	-	-	-	0,0098	0,0063
	Dias et al. (2009)	-	-	0,0018 a 0,0025	-	0,0043 a 0,0088	-
Pêsego/ Ananás	Este trabalho	-	0,20	0,17	-	0,0096	0,033
	Dias et al. (2009) - Pêsego	0,0082	0,17	0,21	-	0,075	0,026
	Murillo et al. (2010) - Ananás	-	-	-	-	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Figo	Este trabalho	-	0,019	-	-	0,022	0,040
	Sue t al. (2002)	0,02	0,04	0,01	0,32	0,08	-

^a – Produto de agricultura biológica

^b- Produto de agricultura convencional

Em relação à laranja e comparativamente com os resultados de Murillo *et al.* (2010) apenas o teor de zeaxantina obtido neste trabalho se encontra acima do referido por estes autores, estando o teor em luteína dentro do intervalo de valores reportado no artigo. Os valores dos teores em carotenóides referidos por Dias *et al.* (2009) são da mesma ordem de grandeza que os obtidos no presente trabalho, com exceção do teor de β -criptoxantina, que se encontra abaixo do referido por esses autores. No entanto, no presente trabalho não foi detetada a presença de α -caroteno na laranja.

Para a maçã, os teores dos carotenóides analisados neste trabalho estão dentro da gama de valores referida por Dias *et al.*

Em relação à pera, foi encontrado um teor em luteína próximo do referido por Dias *et al.* mas não foi detetada a presença de β -criptoxantina que tinha sido reportada pelos mesmos autores.

Relacionando os teores obtidos por Dias *et al.* para a amostra de pêssago com os teores obtidos por Murillo *et al.* (2010) para a amostra de ananás e comparando com os teores obtidos no presente trabalho para a amostra composta de pêssago e ananás, apenas o teor de luteína não está nos intervalos de valores referenciados.

Os valores obtidos por Cardoso *et al.* (2011) para morangos produzidos em modo biológico ou convencional são relativamente superiores ao obtido neste trabalho.

Para a amostra de figo, Su *et al.* (2002), obtiveram teores superiores aos do presente trabalho para a luteína e β -caroteno. Estes autores referem a presença de α -caroteno, β -criptoxantina e luteína que não foram detetados neste trabalho.

Comparando a amostra de néctar (mistura de néctares de diferentes frutos) e de sumo (mistura de sumo de diferentes frutos) analisadas, pode-se verificar que na amostra de sumo só não foi detetada a presença de licopeno, enquanto na amostra de néctar não foi detetada a presença de α -caroteno e o teor de licopeno encontra-se abaixo do limite de quantificação. O carotenoide presente em maior quantidade no néctar foi o β -caroteno e no sumo foi a zeaxantina. Em relação à β -criptoxantina e luteína, foi o sumo que apresentou teores mais elevados.

A Figura 14 representa os resultados obtidos para as amostras de leguminosas analisadas (favas, ervilhas, grão e tremoços) sob a forma de um gráfico de barras, para facilitar a sua comparação.

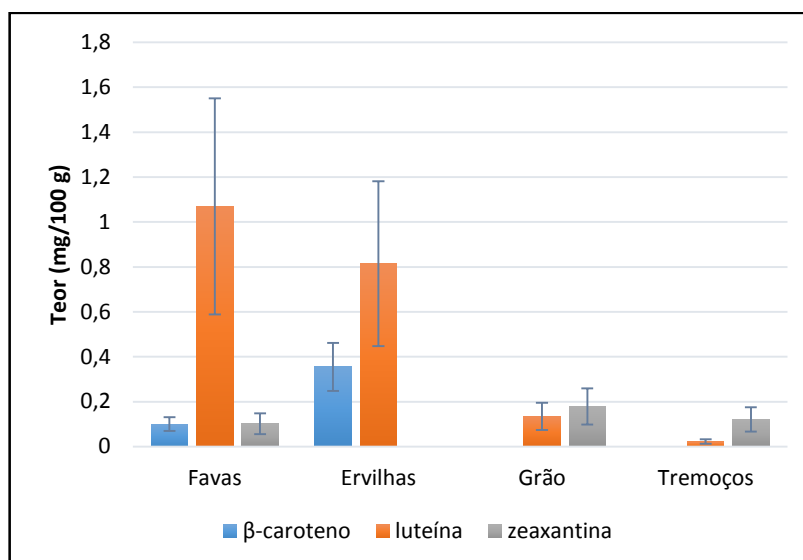


Figura 14 – Teores de carotenoides e respetiva incerteza para amostras de leguminosas

Nestas quatro amostras foi possível identificar e quantificar três carotenoides: β -caroteno, luteína e zeaxantina. Todas amostras apresentaram luteína e a amostra de favas foi a única que apresentou os três carotenoides.

A luteína foi o carotenoide em maior quantidade nas favas e ervilhas. No caso do grão e dos tremoços, o carotenoide presente em maior quantidade foi a zeaxantina.

Uma comparação com resultados recolhidos da literatura é apresentada na Tabela 22.

Tabela 22 – Teores em carotenoides em leguminosas (mg/100 g)

Leguminosas	Referências	β -caroteno	luteína	zeaxantina
Favas	Este trabalho	0,10	1,1	0,10
	El-Qudah (2014)	0,0089	0,2683	-
Ervilhas	Este trabalho	0,35	0,81	-
	Edelenbos <i>et al.</i> (2001)	0,300 a 0,490	1,200 a 1,900	-
Grão	Este trabalho	-	0,13	0,18
	El-Qudah (2014)	0,0077	0,3357	0,1484
Tremoços	Este trabalho	-	0,022	0,12
	Wang <i>et al.</i> (2008)	1,198 a 5,043	1,861 a 2,411	1,623 a 13,504

Em comparação com os resultados de Edelenbos *et al.* (2001) em amostras de ervilhas, o teor obtido neste trabalho para o β -caroteno encontra-se dentro do intervalo referenciado enquanto o teor de luteína é inferior.

Os valores obtidos por El-Qudah (2014) para as amostras de favas e grão são mais elevados que os obtidos neste trabalho, com exceção do teor de zeaxantina, cujos valores se encontram concordantes.

Os teores obtidos por Wang *et al.* (2008) para a amostra de tremoços não são concordantes com os obtidos neste trabalho, sendo que existem diferenças significativas relativamente à ordem de grandeza de ambos os valores.

Na amostra de amendoins e na amostra de ovos só foi detetada a presença de luteína.

Na amostra de batata, o carotenoide presente em maior teor foi a luteína. Murillo *et al.* (2010) também estudaram o teor de luteína e zeaxantina na batata e obtiveram um teor de $0,07 \pm 0,01$ mg/100 g para a luteína e $0,77 \pm 0,06$ mg/100 g para a zeaxantina. O teor obtido para a zeaxantina, no presente trabalho, não é da mesma ordem de grandeza que o referenciado pelos autores, sendo significativamente inferior e o teor de luteína apresenta um desvio de cerca de 61%.

Na amostra de salmão foi detetada e quantificada luteína e zeaxantina; na amostra de carne de vaca, para além desses dois carotenoides, também se quantificou o β -caroteno.

Nas amostras de cereais de pequeno-almoço, pipocas, pão-de-ló e marmelada, foi possível detetar os mesmos carotenoides, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina. Nos pastéis de nata apenas o β -caroteno e a luteína foram detetados.

Uma comparação com os resultados obtidos para outros autores é apresentada na Tabela 23.

Tabela 23 - Teores em carotenóides em alimentos processados

Alimentos Processados	Referências	β -caroteno	β -criptoxantina	luteína	zeaxantina
Cereais	Este trabalho	0,063	0,010	0,069	0,077
	Heinonen <i>et al.</i> (1989)	$0,170 \pm 0,0056$	-	$2,7 \pm 0,080$	-
	Perry <i>et al.</i> (2009)	-	0,011	0,040	0,049
Pipocas	Este trabalho	0,0096	0,012	0,10	0,17
	Heinonen <i>et al.</i> (1989)	$0,063 \pm 0,0011$	-	$1,3 \pm 0,015$	-
	Perry <i>et al.</i> (2009)	0,017	0,024	0,064	0,141
Pão-de-ló	Este trabalho	0,022	0,0023	0,2463	0,26
	Heinonen <i>et al.</i> (1989)	$0,120 \pm 0,0083$	-	$0,066 \pm 0,0024$	-
Amendoins	Este trabalho	-	-	0,054	-
	Heinonen <i>et al.</i> (1989)	$0,002 \pm 0,0001$	-	$0,014 \pm 0,0013$	-

Heinonen *et al.* (1989) realizaram um estudo sobre o teor de carotenoides em alimentos processados, como cereais, pipocas, amendoins e um bolo contendo frutos na sua superfície (assemelhando-se a um bolo de aniversário, não foram encontrados dados relativos ao pão-de-ló). No caso da amostra de amendoins o teor obtido é superior ao obtido através do presente trabalho. Por outro lado, as restantes três amostras analisadas apresentam teores inferiores aos referenciados.

Comparativamente com Perry *et al.* (2009), os teores obtidos para as amostras de cereais e pipocas encontram-se concordantes, com exceção do teor de β -criptoxantina presente na amostra de pipocas, cujo valor foi ligeiramente inferior.

Para a matriz uvas foi também feito um estudo sobre a influência da sazonalidade (das amostras recolhidas no âmbito do projeto *TDSExposure* para estudar a sazonalidade foi a única com mais de uma amostra recolhida no decurso deste trabalho) nos teores determinados. Para isso realizou-se a análise de três amostras de uvas recolhidas em diferentes estações do ano, primavera, verão e outono, e compararam-se os resultados obtidos. Na Tabela 24 apresentam-se os resultados médios obtidos para os carotenoides das três amostras de uvas analisadas.

Tabela 24 - Teores dos carotenoides presentes nas três amostras de uvas analisadas

Analito	Mês da recolha		
	Novembro 2013	Abril/Maio 2014	Agosto/Setembro 2014
	Teor de carotenoides (mg/100 g)		
α -caroteno	ND	ND	ND
β -caroteno	0,020	0,027	0,032
β -criptoxantina	ND	ND	ND
Licopeno	ND	ND	ND
Luteína	0,022	0,038	0,037
zeaxantina	ND	0,0054	0,0087

ND- Não detetado (limites de deteção em mg/100 g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, β -criptoxantina-0,0006, licopeno-0,0008, luteína- 0,0007 e zeaxantina-0,0008)

Na Figura 15 apresentam-se os resultados sob a forma de um gráfico de barras, para facilitar a sua comparação.

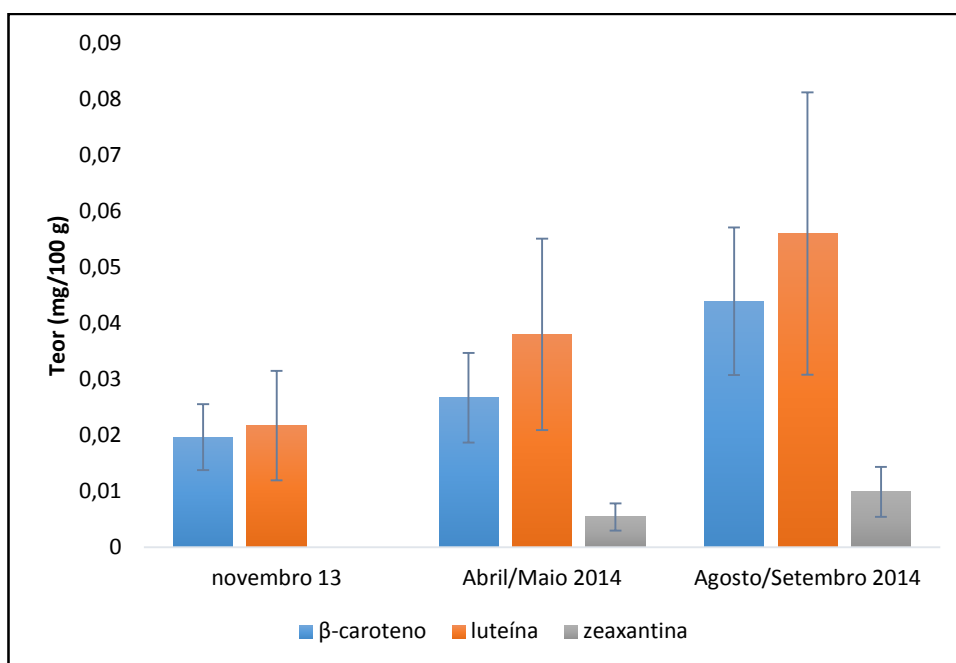


Figura 15 – Teores de carotenoides em amostras de uvas resultantes de três colheitas

Com as análises efetuadas, verificou-se a presença de β -caroteno, luteína e zeaxantina nas amostras de uvas analisadas, sendo que na amostra recolhida em Novembro de 2013 não foi detetado zeaxantina.

O carotenoide que se encontra em maior quantidade nas três amostras de uvas analisadas foi a luteína.

Os resultados obtidos sugerem que o teor em carotenoides é superior no verão correspondendo aos meses de produção deste tipo de fruta em Portugal.

Comparativamente com outros autores, Bunea *et al.* (2012) apresentaram resultados semelhantes para o β -caroteno, num intervalo de 0,0232 – 0,0593 mg/100 g, e valores superiores para a luteína num intervalo de 0,0471 – 0,0825 mg/100 g, consoante a variedade das uvas analisadas. Oliveira *et al.* (2006) realizaram também um estudo do teor de carotenoides presentes em diferentes variedades de uvas e obtiveram teores semelhantes para o β -caroteno, num intervalo de 0,0168 – 0,0910 mg/100 g, e para a luteína entre 0,0218 – 0,1044 mg/100 g.

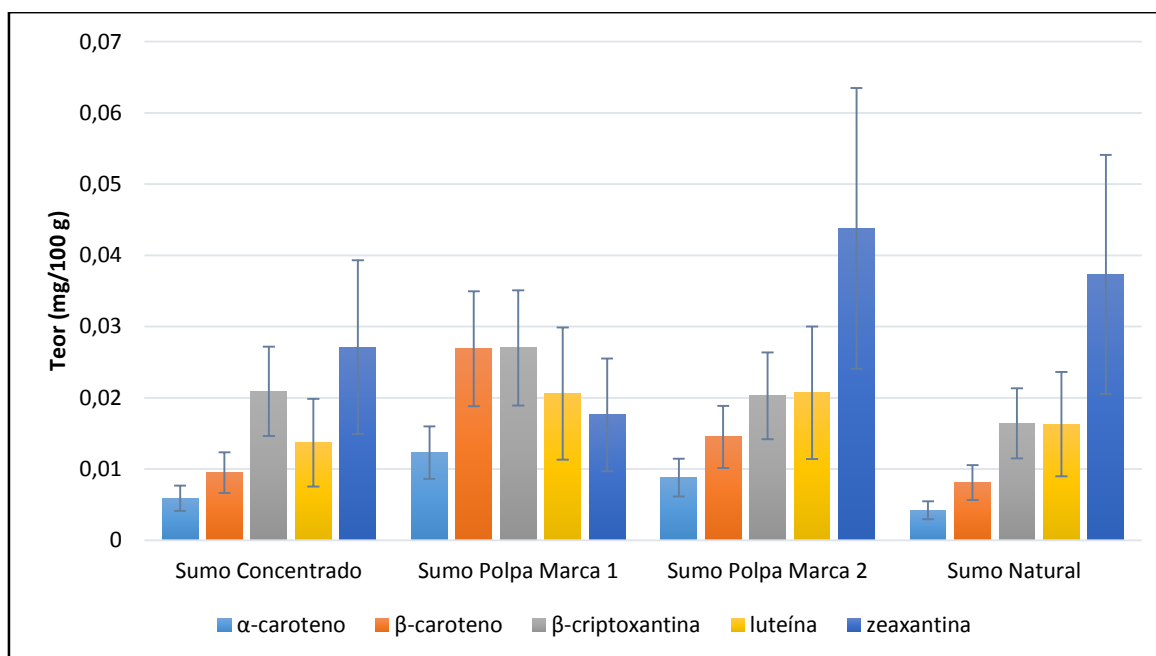
No presente trabalho, analisaram-se também quatro sumos de laranja, obtidos de diferentes formas e de diferentes marcas. Esses resultados encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25 - Teores dos carotenoides presentes nos quatro sumos de laranja analisados

Amostras	Teores carotenoides determinados laboratorialmente (mg/100 g)					
	α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	licopeno	luteína	zeaxantina
Sumo Concentrado	0,0059	0,0095	0,021	ND	0,014	0,027
Sumo Polpa Marca 1	0,012	0,027	0,027	ND	0,021	0,018
Sumo Polpa Marca 2	0,0088	0,015	0,020	ND	0,021	0,044
Sumo Natural	0,0042	0,0081	0,016	ND	0,016	0,037

ND- Não detetado (limites de deteção em mg/100 g: α -caroteno-0,0009, β -caroteno-0,001, β -criptoxantina-0,0006, licopeno-0,0008, luteína- 0,0007 e zeaxantina-0,0008)

Na Figura 16 mostra uma comparação entre os resultados que foram obtidos.

**Figura 16** - Teores de carotenoides em diversos sumos de laranja

Com a análise efetuada, foi possível identificar e quantificar cinco carotenoides presentes nos quatro sumos de laranja analisados, α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina. O carotenoide presente em menor quantidade, nos quatro sumos, foi o α -caroteno. Em relação ao composto presente em maior quantidade, este varia com o tipo de sumo. No caso do sumo obtido a partir de concentrado, sumo de polpa da marca 2 e do sumo natural o composto que se encontrou em maior quantidade foi a zeaxantina. No caso do sumo de polpa da marca 1 o β -caroteno e a β -criptoxantina estavam presentes em teores muito semelhantes, 0,0269 e 0,027 mg/100 g, respetivamente.

O sumo polpa da marca 2 foi aquele que apresentou um maior teor de zeaxantina. No que se refere aos restantes carotenoides, o sumo polpa da marca 1 foi o que apresentou maior teor, sendo que, em relação à luteína, o sumo polpa de marca 2 apresentou o mesmo teor.

Em comparação com outros autores, Murillo *et al.* (2010) estudaram a presença de luteína e zeaxantina em sumo de laranja, e obtiveram teores de $0,01 \pm 0,01$ mg/100 g para ambos os carotenoides. Apenas os teores obtidos para a zeaxantina no sumo de polpa da marca 2 e o sumo natural foram ligeiramente superiores. Os restantes teores são concordantes.

Meléndez-Martínez *et al.* (2003) também realizaram um estudo em sumo de laranja previamente congelados e obtiveram $0,069 \pm 0,027$ mg/100 g para a β -criptoxantina, $0,011 \pm 0,005$ mg/100 g para o α -caroteno e $0,021 \pm 0,007$ mg/L para o β -caroteno, teores concordantes como os obtidos neste trabalho.

A análise de resultados que foi apresentada mostra que existe uma grande variabilidade nos teores de carotenoides, não só no presente trabalho mas também comparando diferentes trabalhos publicados na literatura. Essas diferenças podem ser justificadas pelos vários fatores que influenciam o perfil de carotenoides, como a espécie, variedade, condições do solo, entre outras. Assim, torna-se importante analisar os alimentos consumidos no próprio país, não sendo adequado recorrer ao uso de tabelas de composição de outros países para os carotenoides analisados.

Vitaminas A e E

Nas Figuras 17 e 18, a título exemplificativo, apresentam-se dois cromatogramas relativos à análise das amostras de pão-de-ló e uvas contendo as vitaminas A e E, respetivamente.

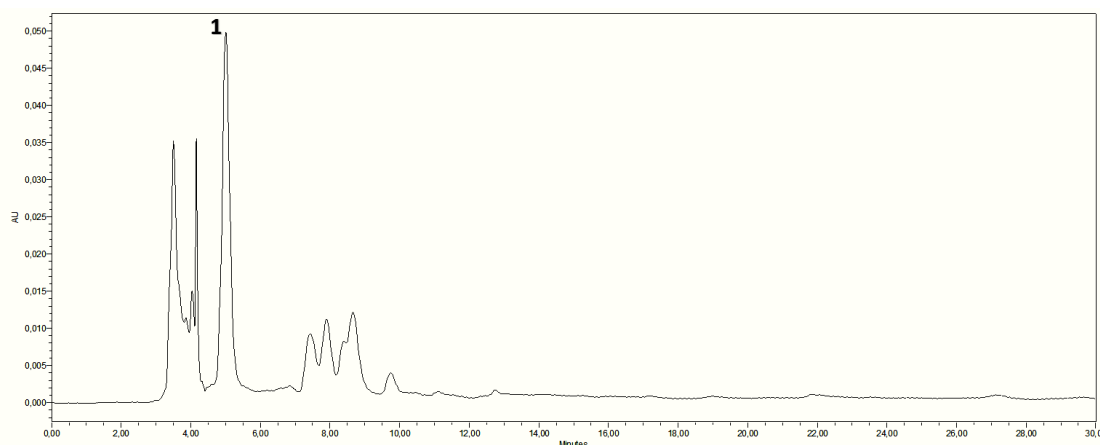


Figura 17 – Cromatograma da amostra de pão-de-ló contendo 1- vitamina A (tr = 3,581 min)

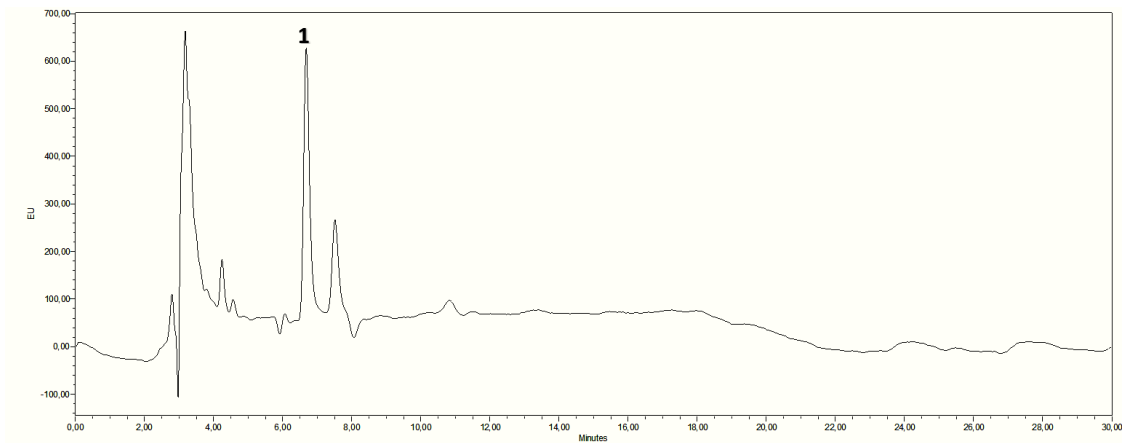


Figura 18 - Cromatograma da amostra de uvas Abril/Maio 2014 contendo 1- vitamina E (tr= 6,662 min)

Na Tabela 26, apresentam-se os valores médios obtidos para a vitamina A e vitamina E para cada amostra analisada em duplicado, e respetivas incertezas.

Tabela 26 - Teores de vitamina A e vitamina E presentes nas amostras analisadas

Amostras	Teores de vitamina A e E determinados laboratorialmente (mg/100 g)	
	Vitamina A	Vitamina E
Ovos	0,18 ± 0,05	2,2 ± 0,7
Ervilhas	ND	0,20 ± 0,06
Carne Vaca	ND	0,12 ± 0,04
Pasteis Nata	0,07 ± 0,02	0,8 ± 0,2
Salgados	ND	1,7 ± 0,5
Uvas Novembro 2013	ND	0,30 ± 0,09
Pão-de-ló	0,20 ± 0,08	0,6 ± 0,2
Laranja	ND	0,10 ± 0,03
Salada de Frutas	ND	0,09 ± 0,03
Uvas Abril/Maio 2014	ND	1,0 ± 0,3
Cereais	ND	0,3 ± 0,1

ND- Não detetado (limite de deteção: vitamina A-0,0016 mg/100 g)

A vitamina A encontra-se presente em alimentos de origem animal. De todas as amostras analisadas só três delas, ovos, pão-de-ló e pastéis de nata, apresentavam vitamina A. A amostra que apresentou maior teor em vitamina A foi o pão-de-ló.

Foi possível detetar/quantificar a vitamina E em 11 amostras do número total de amostras analisadas. A amostra que apresentou um teor mais elevado foi a amostra de ovos; enquanto a que apresentou um teor mais baixo foi a salada de frutas.

Heinonen *et al.* (1989) estudaram o teor de vitamina A, expresso em equivalentes de retinol, no bolo com frutos à superfície. O valor obtido foi de 0,00069 mg/100 g.

Chun *et al.* (2006) estudaram o teor de vitamina E nas laranjas e o valor obtido foi de 0,25 mg/100 g, superior ao obtido no presente trabalho.

Piironen *et al.* (1986) estudaram o teor de vitamina E num bolo que se assemelha ao pão-de-ló em cereais. Obtiveram 0,04 mg/100 g para os cereais e 0,35 mg/100 g para a amostra de bolo. O teor obtido neste trabalho para os cereais é bastante superior ao valor referenciado, tal como acontece com o teor de vitamina E no bolo, embora estes últimos sejam da mesma ordem de grandeza.

Seker *et al.* (2012) determinaram o teor de vitamina E presente em diferentes variedades de uvas e os teores obtidos variam entre 0,231 e 3,642 mg/100 g. O teor obtido no presente trabalho encontra-se dentro do intervalo referenciado.

5.3.1. Avaliação da vitamina A nas amostras que continham carotenoides

A contribuição de alguns carotenoides para a ingestão de vitamina A pode ser expressa em equivalentes de atividade de retinol (RAE), que é equivalente a 1 µg de retinol, 12 µg de β-caroteno, 24 µg de α-caroteno ou 24 µg de β-criptoxantina (Campos, 2005).

Na Tabela 27 apresenta-se o teor de vitamina A, expressa em equivalentes de retinol, presente nas amostras analisadas, o qual foi determinado através da equação (1).

Tabela 27 – Teor de vitamina A expresso em equivalentes de retinol presente nas amostras analisadas

Amostras	Teor de Vitamina A em RAE (mg/100 g)
Laranja	0,0073
Maçã	0,0020
Morango	0,00076
Pera	0,00010
Pêssego/Ananás	0,023
Figo	0,0016
Salada de Frutas	0,0087
Néctar	0,0097
Sumo	0,0025
Favas	0,0083
Ervilhas	0,030
Batata	0,00040
Carne Vaca	0,0012
Salgados	0,0016
Empadão	0,0046
Ovos	0,18
Cereais	0,0057
Marmelada	0,0028
Pipocas	0,0013
Pão-de-ló	0,21
Pastéis Nata	0,076
Uvas Abril/Maio 14	0,0022
Uvas Novembro 13	0,0016
Uvas Agosto/Setembro 14	0,0027

Através dos teores de vitamina A calculados é possível verificar que a amostra que contém o maior teor desta vitamina é a amostra de pão-de-ló, seguida da amostra de ovos. As amostras que apresentam um maior teor são de origem animal (ovos) ou contêm ingredientes de origem animal (pão-de-ló). A amostra que contém um menor teor é a amostra de pera, seguida da amostra de batata.

6. Conclusão

O trabalho realizado possibilitou a obtenção de um material de referência interno, contendo todos os carotenoides em estudo. A aplicação dos testes estatísticos revelou que o processo de homogeneização utilizado permitiu obter uma matriz composta homogénea para os diferentes analitos. Estes resultados complementados com estudos de estabilidade a médio/longo prazo, realizados no laboratório para matrizes semelhantes, permitiram concluir que este material é adequado para utilização em rotina como material de referência interno, conduzindo a um melhor controlo do método analítico e à redução de custos.

O método analítico que se encontrava validado para a determinação dos carotenoides apresentou resultados fiáveis que permitem a sua utilização regular para a determinação da vitamina A e vitamina E nas amostras em que se pretende avaliar os carotenoides, economizando tempo e reagentes. No entanto os estudos de precisão realizados deverão ser complementados com outras matrizes.

Os limites de deteção e quantificação obtidos para a vitamina A foram de 0,065 µg/mL e 0,20 µg/mL, respetivamente. Para a vitamina E foi obtido um valor de 0,78 µg/mL para o limite de deteção e 2,4 µg/mL para o limite de quantificação.

Os valores dos coeficientes de variação para a precisão intermédia e para a repetibilidade obtidos para a vitamina A foram de 11,4% e 14,4%, respetivamente. Para a vitamina E os valores dos coeficientes de variação obtidos foram de 10,0% para a precisão intermédia e 10,3% para a repetibilidade. Estes valores são inferiores a 15%, sendo possível afirmar que o método apresenta uma boa repetibilidade e precisão intermédia para as matrizes estudadas.

Quanto à exatidão do método, os valores de *z-score* foram todos inferiores a 2, pelo que se pode dizer que foi um resultado satisfatório, confirmando-se a exatidão do método.

A incerteza expandida relativa combinada foi de 30% para a vitamina E e 40% para a vitamina A, pelo que os resultados devem, em geral, ser apresentados com dois algarismos significativos.

A luteína foi o carotenoide detetado e quantificado em todas as amostras analisadas. A amostra de salada de frutas foi a única que continha todos os carotenoides analisados.

De acordo com a revisão bibliográfica, para a análise de carotenoides o método mais utilizado é definitivamente HPLC. No entanto, com a pesquisa realizada foi possível verificar que já existem trabalhos realizados em que se utiliza UHPLC. Esta

técnica é bastante promissora para a determinação destes analitos, uma vez que permite a redução da quantidade de solventes necessários, assim como o tempo necessário para as análises, os principais problemas na utilização da técnica de HPLC.

De acordo com a análise bibliográfica realizada no âmbito do contributo para uma base de dados Ibero-Americana, o teor de carotenoides em alimentos deve sempre incluir a identificação tão completa quanto possível do alimento (espécie, variedade), assim como o local e data de produção, e ainda o detalhe do método analítico como é evidenciado pela grande variabilidade encontrada para um mesmo alimento.

7. Proposta de trabalho futuro

Apresentam-se algumas propostas relacionadas com o presente trabalho que poderão ser realizadas futuramente:

- Estudo de outras matrizes alimentares inseridas no projeto *TDSExposure*, nomeadamente produtos hortícolas e refeições que contenham frutos ou produtos hortícolas na sua constituição, com o objetivo de estudar e avaliar a ingestão de carotenoides dos portugueses;
- Tendo em consideração a variação encontrada nos teores de carotenoides das amostras analisadas e na literatura, determinar os carotenoides nas amostras recolhidas sazonalmente, no âmbito do projeto *TDSExposure*;
- Complementar os estudos de precisão para as vitaminas A e E, utilizando outras matrizes.

8. Referências Bibliográficas

Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P. (2014), *Review of methods for analysis of carotenoids*, Trends in Analytical Chemistry 56, p. 49-73;

Antunes S.I.M. (2007), *Micronização supercrítica do β -caroteno*, Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Atienza S.G., Ballesteros J., Martín A., Hornero-Méndez D. (2007), *Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (*xTritordeum ascherson et graebner*) and durum wheat accessions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (10), p. 4244-4251;

Ball G.F.M. (1988), *Fat-soluble vitamin assays in food analysis - A comprehensive Review*, Elsevier Applied Science;

Bendich A., Olsont J.A. (1989), *Biological actions of carotenoids*, The FASEB Journal 3, p. 1927- 1932;

Biehler E., Bohn T. (2010), *Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability*, Current Nutrition & Food Science 6, p. 44-69;

Bijttebier S., D'Hondt E., Noten B., Hermans N., Apers S., Voorspoels S. (2014), *Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening*, Journal of Chromatography A 1332, p. 46-56;

Borek C. (2004), *Dietary Antioxidants and Human Cancer*, Integrative Cancer Therapies 3, p. 333-341;

Brenner S.A. (1994), *The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers*, The new England Journal of Medicine 15 (330), p. 1029-1035;

Britton G. (1995), *Structure and properties of carotenoids in relation to function*, The FASEB Journal 9, p. 1551-1558;

Bunea C.I., Pop N., Babes A.C., Matea C., Dulf F.V., Bunea A. (2012), *Carotenoids, total polyphenols and antioxidante activity of grapes (Vitis vinífera) cultivated in organic and conventional systems*, Chemistry Central Journal 6 (66), p. 1-9;

Cacciola F., Donato P., Giuffrida D., Torre G., Dugo P., Mondello L. (2012), *Ultra high pressure in the second dimension of a comprehensive two-dimensional liquid chromatographic system for carotenoid separation in red chili peppers*, Journal of Chromatography A 1255, p. 244–51;

Campos F.M., Rosado G.P. (2005), *Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A*, Ciência e Tecnologia de Alimentos 25 (3), p. 571-578;

Cardoso P.C., Tomazini A.P.B., Stringheta P.C., Ribeiro S.M.R., Pinheiro-Sant'Ana HM (2011), *Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil*, Food Chemistry 126 (2), p. 411-416;

Carvalho L.M.J., Oliveira A.R.G., Godoy R.L.O., Pacheco S., Nutti M.R., De Carvalho J.L.V., Fukuda W.G. (2012), *Retention of total carotenoid and β -carotene in yellow sweet cassava (manihot esculenta crantz) after domestic cooking*, Food and Nutrition Research 56, p.1-8;

Castenmiller J.J.M., West C.E. (1998), *Bioavailability and bioconversion of carotenoids*, Annual Review of Nutrition 18, p. 19-38;

Chauveau-Duriot B., Doreau M., Nozière P., Graulet B. (2010), *Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2), p. 777-790;

Chuvair A.J., Rotstein N.P., SanGiovanni J.P., During A., Chew E.Y., Politi L.E. (2007), *Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid*, Investigative Ophthalmology & Visual Science 48 (11), p. 5168-5177;

Chun J., Lee J., Exler J., Eitenmiller R.R. (2006), *Tocopherol and tocotrienol contentes of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet*, Journal of Food Composition and Analysis 19, p. 196-204;

Claessens H.A., van Straten M.A. (2004), *Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1060 (1-2), p. 23–41;

Committee for Medicinal Products for Human Use (2011), *Guideline on Bioanalytical method validation*, European Medicines Agency;

Congdon N., O'Colmain N.B., Klaver C.C. (2004), *Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States*, Archives of Ophthalmology 122, p. 477–485;

Costa T.S.A., Wondracek D.C., Lopes R.M., Vieira R.F., Ferreira F.R. (2010), *Composição de carotenoides em canistel*, Revista Brasileira de Fruticultura 32 (3), p. 903- 906;

Daood H.G., Bencze G., Palotás G., Pék Z., Sidikov A., Helyes L. (2013), *HPLC Analysis of Carotenoids from Tomatoes Using Cross-Linked C18 Column and MS Detection*, Journal of Chromatographic Science 26, p. 1–7;

Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) (2012), *Controlo da Qualidade Interno - Métodos Cromatográficos*, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;

Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) (2012), *Determinação do teor de carotenoides por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)*, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;

Decreto-Lei nº 193, 18 de Agosto de 2000, Anexo I;

Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011, Artigo 30º, anexo XIII;

Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2008), *Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production*, Food Chemistry 109, p. 815-824;

Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2009), *Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables*, Food Chemistry 113, p. 808-815;

Dugo P., Giuffrid D., Herrero M., Donato P., Mondello L. (2009), *Epoxy-carotenoids esters analysis in intact orange juices using two-dimensional comprehensive liquid chromatography*, Journal of Separation Science 32 (7), p. 973-980;

Dugo P., Herrero M., Kumm T., Giuffrid D., Dugo G., Mondello L. (2008), *Comprehensive normal-phase x reversed-phase liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection for the analysis of free carotenoids and carotenoid esters from mandarin*, Journal of Chromatography A 1189 (1-2), p. 196-206;

Dugo P., Veronika S., Kumm T., Trozzi A., Jandera P., Mondello L. (2006), *Elucidation of Carotenoid Patterns in Citrus Products by Means of Comprehensive Normal-Phase x Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Analytical Chemistry 78 (22), p. 7743-7750;

Edelenbos M., Christensen L.P., Grevsen K. (2001), *HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (Pisum sativum L.)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, p. 4768-4774;

Ekesa B., Poulaert M., Davey M.W., (2012), *Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (Musa spp.) and derived dishes in African countries*, Food Chemistry 133, p. 1471-1477;

El-Qudah J.M. (2014), *Estimation of carotenoid contents of selected mediterranean legumes by HPLC*, World Journal of Medical Sciences 10 (1), p. 89-93;

FAO/INFOODS (2012), *Guidelines for converting units, Denominators and Expressions*, version 1.0;

Fearn T., Thompson M. (2001), *A new test for 'sufficient homogeneity'*, Analyst 126, p. 1414-1417;

Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R.J. (1999), *Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, p. 4301-4309;

Gerster H. (1997), *The potential role of lycopene for human health*, The Journal of the American College of Nutrition 16, p. 109-126;

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., de la Torre M.C., López-Sabater M.C. (2000), *Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 881, p. 251-254;

Gleize B., Steib M., André M., Reboul E. (2012), *Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q₁₀ and carotenoids in complex samples*, Food Chemistry 134, p. 2560-2564;

González A.G., Herrador M.A. (2007), *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*, Trends in Analytical Chemistry 26 (3), p. 227- 238;

Goulinet S., Chapman M.J. (1997), *Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17, p. 786–796;

Granado F., Olmedilla B., Blanco I. (2003), *Nutritional and clinical relevance of lutein in human health*, British Journal of Nutrition 90, p. 487-502;

Guia ISO/IEC 99 (2008), Vocabulário Internacional de Metrologia, Instituto Português da Qualidade;

Hao Z., Parker B., Knapp M., Yu L. (2005), *Simultaneous quantification of alpha-tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1094 (1-2), p. 83–90;

He F.J., Nowson C.A., Lucas M., MacGregor G.A. (2007), *Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies*, Journal of Human Hypertension 21, p. 717-728;

Heinonen M., Ollilainen V., Linkola E., Varo P., Koivistoinen P. (1989), *Carotenoids and retinoids in finnish foods: Cereal and bakery products*, Cereal Chemistry Journal 66 (4), p. 270-273;

Hoppe P.P., Krennrich G. (2000), *Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic α -tocopherol in the human: a dispute*, European Journal of Nutrition 39 (5), p. 183-193;

Hornero-Méndez D., Mínguez-Mosquera M.I. (2000), *Carotenoid pigments in rosa mosqueta hips, an alternative carotenoid source for foods*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (3), p. 825-828;

Huck C.W., Popp M., Scherz H., Bonn G.K. (2000), *Development and Evaluation of a New Method for the Determination of the Carotenoid Content in Selected Vegetables by HPLC and HPLC – MS – MS*, Journal of Chromatographic Science 38, p. 441–449;

Inmetro (2011), *Coordenação Geral de Acreditação, Orientação sobre validação de métodos analíticos*, Instituto Nacional de Metrologia, DOQ-CGCRE-008 Revisão 04;

Instituto Português da Acreditação (IPAC) (2007), *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaio Químicos*;

International Standard Organization (2005), *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025;

Jadoon S., Malik A., Qazi M.H., Aziz M. (2013), *Spectrophotometric method for the determination of Vitamin A and E using Ferrozine-Fe(II) complex*, Asian Journal of Research Chemistry 6 (4), p. 334-340;

Johnson E.J. (2002), *The role of carotenoids in human health*, Nutrition in Clinical Care 5(2), p. 47–9;

Kelemen L.E., Cerhan J.R., Lim U., Davis S., Cozen W., Schenk M., Colt J., Hartge P., Ward M.H. (2006), *Vegetables, fruit, and antioxidant-related nutrients and risk of non-Hodgkin lymphoma: a National Cancer Institute-Surveillance, Epidemiology, and End results population-based case-control study*, The American Journal of Clinical Nutrition 83, p. 1401-1410;

Kohlmeier L., Kark J.D., Gomez-Garcia E., Martin B.C., Steck S.E., Kardinaal A.F. (1997), *Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study*, American Journal of Epidemiology 146, p.618–626;

Krinsky N.I., Johnson E.J. (2005), *Carotenoid actions and their relation to health and disease*, Molecular Aspects of Medicine 26 (6), p. 459–516;

Kritchevsky S.B. (1999), *β -Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease*, The Journal of Nutrition 129, p. 5-8;

Layne J. (2002), *Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases*, Journal of Chromatography A 957 (2), p. 149–64;

Leboulanger J. (1978), *As Vitaminas - Bioquímica - Modo de acção - Interesse terapêutico*, Roche;

Lee C.M., Boileau A.C., Boileau T.W.M., Williams A.W., Swanson K.S., Heintz K.A., Erdman J.W. (1999), *Review of animal models in carotenoid research*, Journal of Nutrition 129, p. 2271-2277;

Liga Portuguesa contra o Cancro (2009), *Morrem 42 mil pessoas com cancro por ano em Portugal*, consultada em 6 de Outubro de 2014: <http://www.ligacontracancro.pt/noticias/detalhes.php?id=242>;

Lozano-Alejo N., Carrillo G.V., Pixley K., Palacios-Rojas N. (2007), *Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks*, Innovative Food Science and Emerging Technologies 8 (3), p. 385-389;

Lu S., Li L. (2008), *Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond*, Journal of Integrative Plant Biology 50 (7), p. 778-785;

Maia L.M.J. (2006), *Azeites DOP: Avaliação dos carotenoides maioritários (β -caroteno e luteína)*, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto;

Margalith P.Z. (1999), *Production of ketocarotenoids by microalgae*, Applied Microbiology and Biotechnology 51, p. 431-438;

Matsubara A., Bamba T., Ishida H., Fukusaki E., Hirata K. (2009), *Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry*, Journal of Separation Science 32 (9), p. 1459–1464;

Matsubara A., Uchikata T., Shinohara M., Nishiumi S., Yoshida M., Fukusaki E., Bamba T. (2012), *Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry*, Journal of Bioscience and Bioengineering 113 (6), p. 782–787;

Meléendez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J. (2003), *A routine High-Performance Liquid Chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, p. 4219-4224;

Meléendez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J. (2007), *Review: Analysis of carotenoids in orange juice*, Journal of Food Composition and Analysis, 20 (7), p. 638–649;

Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. (1996), *Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls*, FEBS Letters 384, p. 240-242;

Mortensen A., Skibsted L.H. (1997), *Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy*, FEBS Letters 417, p. 261-266;

Msagati T.A.M. (2013), *Chemistry of food additives and preservatives*, 1st ed., Wiley-BlackWell;

Murillo E., Giuffrida D., Menchaca D., Dugo P., Torre G., Meléndez-Martínez A.J., Mondello L. (2013), *Native carotenoids composition of some tropical fruits*, Food Chemistry, 140 (4), 825-836;

Murillo E., Meléndez-Martínez A.J., Portugal F. (2010), *Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin*, Food Chemistry 122, p. 167-172;

National Institutes of Health (2013) *Vitamin A - Facts Sheet for health professionals*, U.S. Department of Health & Human Services, consultada em 3 de Setembro de 2014: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-HealthProfessional/#en4>;

National Institutes of Health (2013) *Vitamin E - Facts Sheet for health professionals*, U.S. Department of Health & Human Services, consultada em 4 de Novembro de 2014: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/>;

National Academy of Science - NAS (2001) Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, *Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*, consultada em 6 de Outubro de 2014: http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/New%20Material/7_%20Nutrients%20Summary.pdf;

National Research Council (1989), *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., Washington DC, The National Academies Press;

Nollet L.M.L., Toldrá F. (2013), *Food analysis by HPLC*, 3rd ed., CRC Press;

O'Connell O.F., Ryan L., O'Brien N.M. (2007), *Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables*, *Nutrition Research* 27, p. 258-264;

Okada T., Nakai M., Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Miyashita K. (2008), *Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells*, *Journal of Oleo Science* 57 (6), p. 345-351;

Oliveira C., Barbosa A., Ferreira A.C.S., Guerra J., Pinho A.P.G. (2006), *Carotenoid profile in grapes related to aromatic compounds in wines from Douro region*, *Journal of food science* 71 (1), p. 31-37;

Oliver J., Palou A. (2000), *Chromatographic determination of carotenoids in foods*, *Journal of Chromatography A* 881, p. 543-555;

Omenn G.S. (1998), *Chemoprevention of lung cancer: The rise and demise of beta-carotene*, *Annual Review of Public Health* 19, p. 73-99;

Ong A.S.H., Tee E.S. (1992), *Natural sources of carotenoids from plants and oils*, Methods in Enzymology 213, p.142–67;

Paiva S., Russell R. (1999), *Beta carotene and other carotenoids as antioxidants*, Journal of the American College of Nutrition 18, p. 426–33;

Parada J., Aguilera J.M. (2007), *Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients*, Journal of Food Science 72, p. 21-32;

Park Y.K., Park E., Kim J.S., Kang M.H. (2003), *Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans*, Mutation Research 529, p. 77-86;

Perry A., Rasmussen H., Johnson E.J. (2009), *Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products*, Journal of Food Composition and Analysis 22, p. 9-15;

Piironen V., Syväoja E.L., Varo P., Salminen K., Koivistoinen P. (1986), *Tocopherols and tocotrienols in cereal products from Finland*, Cereal Chemistry Journal 63 (2), p. 78-81;

Plozza T., Trenerry V.C., Caridi D. (2012), *The simultaneous determination of vitamins A, E and β -carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry (HPLC-MSⁿ)*, Food Chemistry 134, p. 559-563;

Porrini M., Riso P., Brusamolino A., Berti C., Guamieri S., Visioli F. (2005), *Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection*, British Journal of Nutrition 93, p. 93-99;

Quirós A.R.B., Costa H.S. (2006), *Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review*, Journal of Food Composition and Analysis 19, p. 97-111;

Rao A.V., Rao L.G. (2007), *Carotenoids and human health*, Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society 55 (3), p. 207–216;

Rao K.S., Keshar N.K., Belorkar N.V., Rao M.E.B., Srinivasa K., Pattnaik A.K. (2013), *A simple and rapid HPLC method for the simultaneous determination of vitamin A and vitamin E in tablet dosage forms*, Research Journal of Chemical and Environmental Sciences 1 (1), p. 2-6;

Relacre (2000), *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, IPQ, Portugal;

Ribani M., Bottoli C.B.G., Melo L.F.C. (2004), *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*, Química Nova 27 (5), p. 771 – 780;

Rivera S.M., Canela-Garayoa R. (2012), *Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials*, Journal of Chromatography A 1224, p. 1-10;

Rivera S.M., Christou P., Canela-Garayoa R. (2013), *Identification of carotenoid using mass spectrometry*, Mass Spectrometry Reviews 9999, p. 1-20;

Rivera S., Vilaró F., Canela R. (2011), *Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 400 (5), p. 1339-1346;

Rodriguez-Amaya D.B. (1997), *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Food*, Office of Health and Nutrition, Bureau for Global Programs, Field Support and Research, U.S. Agency for International Development;

Rodriguez-Amaya D.B. (2001), *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI Press;

Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. (2004), *HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis*, HarvestPlus Technical Monographs;

Rodriguez-Amaya D.B., Rodriguez E.B., Amaya-Farfan J. (2006), *Advances in Food Carotenoid Research: Chemical and Technological Aspects, Implications in Human Health*, Malaysian Journal of Nutrition 12 (1), p. 101 – 121;

Roman M.J., Burri B.J., Singh R.P. (2012), *Release and bioaccessibility of β -Carotene from fortified almond butter during in vitro digestion*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, p. 9659-9666;

Ruel M.T. (2001), *Can food-based strategies help reduce vitamin a and iron deficiencies? A review of recent evidence*, International Food Policy Research Institute;

Russell R.M. (2002), *Beta-carotene and lung cancer*, Pure and Applied Chemistry 8 (74), p. 1461-1467;

Salo-Väänänen P., Ollilainen V., Mattiba P., Lehtikoinen K., Salmela-Mölsä E., Piironen V. (2000), *Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction*, Food Chemistry 71, p. 535-543;

Seker M.E., Çelik A., Dost K. (2012), *Determination of vitamin E isomers of grape seeds by High-performance Liquid Chromatography-UV detection*, Journal of Chromatographic Science 50, p. 97-101;

Shami N.J.I.E., Moreira E.A.M.M. (2004), *Licopeno como agente antioxidante*, Revista de Nutrição 17 (2), p. 227-236;

Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. (2014), *Cancer statistics*, CA: A Cancer Journal for Clinicians 64, p. 9-29;

Siluk D., Oliveira R.V., Esther-Rodriguez-Rosas M., Ling S., Bos A., Ferrucci L., Wainer I.W. (2007), *A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (4), p. 1001-1007;

Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2007), *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed., Thomson Brooks/Cole;

Snodderly D.M. (1995), *Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins*, American Journal of Clinical Nutrition 62, p. 1448S-1461S;

Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. (2010), *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed., Wiley;

Stahl W., Sies H. (2005), *Bioactivity and protective effects of natural carotenoids*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1740 (2), p. 101 – 107;

Stinco C.M., Fernández-Vázquez R., Escudero-Gilete M.L., Heredia F.J., Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M. (2012), *Effect of orange juices processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (6), p. 1447-1455;

Su Q., Rowley K.G., Itsiopoulos C., O'Dea K. (2002), *Identification and quantification of major carotenoids in selected componentes of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil*, *European Journal of Clinical Nutrition* 56, p. 1149-1154;

Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H. (2012), *Cancer chemoprevention by carotenoids*, *Molecules* 17 (3), p. 3202-3242;

Tang F.Y. (2012), *The silver bullet for cancer prevention: Chemopreventive effects of carotenoids*, *BioMedicine* 2, p. 117-121;

Tang G. (2010), *Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans*, *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, p. 1468S-1473S;

Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. (2004), *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies*, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58 (2), p. 100-110;

van Breemen R.B., Dong L., Pajkovic N.D. (2012), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry of Carotenoids*, *International Journal of Mass Spectrometry* 312, p. 163–172;

van der Berg H., Faulks R., Granado H.F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S., Stahl W. (2000), *The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects*, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, p. 880-912;

van Duyn M.A., Pivonka E. (2000), *Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature*, Journal of the American Dietetic Association 100, p. 1511-1521;

Wada Y., Matsubara A., Uchikata T., Iwasaki Y., Morimoto S., Kan K., Bamba T. (2011), *Metabolic profiling of β -cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, Journal of Separation Science 34 (24), p. 3546–3552;

Wang S., Errington S., Yap H.H. (2008), *Studies on carotenoids from lupin seeds*, "Lupins for Health and Wealth" Proceedings of the 12th International Lupin Conference, p. 198-202;

Waters, *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?* (2014), Waters, The science of what's possible, consultado em 25 de Agosto de 2014: http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_us&cid=10049055;

Wegner A., Khoramnia R. (2011), *Cataract is a self-defence reaction to protect the retina from oxidative damage*, Medical Hypotheses 76 (5), p. 741–744;

WHO (2008), *High Pressure Liquid Chromatography*, The Internacional Pharmacopeia, consultado em 25 de Agosto de 2014: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>;

WHO (2014), *Micronutrient deficiencies – Vitamin A deficiency*, World Health Organization, consultado em 16 de Outubro de 2014; <http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/>

Yeum K.J., Russell R.M., Krinsky N.I., Aldini G. (2004), *Biomarkers of antioxidante capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma*, Archives of Biochemistry and Biophysics 430, p. 97-103;

Young A.J., Lowe G.M. (2001), *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids*, Archives of Biochemistry and Biophysics 385 (1), p. 20-27.

Anexos

Anexo 1

A tabela foi construída com base nas seguintes referências bibliográficas:

Agócs A., Nagy V., Szabó Z., Márk L., Ohmacht R., Deli J. (2007), *Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species*, Innovative Food Science and Emerging Technologies 8, p. 390-394;

Amoussa-Houngpatin W., Mouquet-Rivier C., Kayodé A.P.P., Hounhouigan J.D., Avallone S. (2013), *Effect of a multi-step preparation of amaranth and palm nut sauces on their carotenoid content and retinol activity equivalente values*, International Journal of Food Science & Technology 48, p. 204-210;

Andersson S.C., Rumpunen K., Johansson E., Olsson M.E. (2011), *Carotenoid content and composition in rose hips (Rosa spp.) during ripening, determination of suitable maturity marker and implications for health promoting food products*, Food Chemistry 128, p. 689-696;

Azevedo-Meleiro C.H., Rodriguez-Amaya D.B. (2009), *Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS*, Journal of Separation Science 32, p. 3652-3658;

Capanoglu E., Beekwilder J., Boyacioglu D., Hall R., De Vos R. (2008), *Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, p. 964-973;

Courraud J., Berger J., Cristol J.P., Avallone S. (2013), *Stability and bioaccessibility of diferente forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion*, Food Chemistry 136, p. 871-877;

Crupi P., Milella R.A., Antonacci D. (2010), *Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI+) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes*, Journal of Mass Spectrometry 45, p. 971-980;

Divya P., Puthusseri B., Neelwarne B. (2012), *Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (Coriandrum sativum L.) varieties*, Food Research Internacional 46, p. 342-350;

Djuikwo V.N., Ejoh R.A., Gouado I., Mbofung C.M., Tanumihardjo S.A. (2011), *Determination of major carotenoids in processed tropical leafy vegetables indigenous to Africa*, Food and Nutrition Sciences 2, p. 793-802;

Fратиanni A., Di Criscio T., Mignogna R., Panfili G. (2012), *Carotenoids, tocopherols and retinols evolution during egg pasta – making processes*; Food Chemistry 131, p. 590-595;

Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C., Dugo G. (2013), *Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination*, Food Chemistry 140, p. 794-802;

Hernández-Ortega M., Ortiz-Moreno A., Hernández-Navarro M.D., Chamorro-Cevallos, Dorantes-Alvarez L., Necochea-Mondragón H. (2012), *Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (Capsicum annuum L.)*, Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012, p. 1-10;

Iraldi M.N., Samanidou V.F., Papadoyannis I.N. (2011), *Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and carotenoids in cereals after solid-phase extraction*, Journal of Separation Science 34, p. 1375-1382;

Jacobo-Velázquez D.A., Hernández-Brenes C. (2012), *Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage*, Innovative Food Science and Emerging Technologies 16, p.121-128;

Kao F.J., Chiu Y.S., Tsou M.J., Chiang W.D. (2012), *Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan*, LWT - Food Science and Technology 46, p. 485-492;

Kao T.H., Loh C.H., Inbaraj B.S., Chen B.H. (2012), *Determination of carotenoids in Taraxacum formosanum by HPLC–DAD–APCI-MS and preparation by column chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 66, p. 144-153;

Lachman J., Hejtmánková K., Kotíková Z. (2013), *Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: Selection for breeding and production*, Journal of Cereal Science 57, p. 207-214;

Leopoldo G.C., Santiago F.K., Arturo B.P.L., Norma G.V., Aurea B.N. (2012), *Carotenoid content, antioxidante activity and sensory evaluation of low-calorie nopal (Opuntia ficus-indica) marmalade*, Journal of Food Processing and Preservation 36, p. 267-275;

Li H., Deng Z., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2012), *Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines*, Food Chemistry 132, p. 508-517;

Loranty A., Rembiałkowska E., Rosa E.A.S., Bennett R.N. (2010), *Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas*, Journal of Food Composition and Analysis 23, p. 432-441;

Marinova D., Ribarova F. (2007), *HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries*, Journal of Food Composition and Analysis 20, p. 370-374;

Mateos R., García-Mesa J.A. (2006), *Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 385, p. 1247-1254;

Mazzeo T., N'Dri D., Chiavaro E., Visconti A., Fogliano V., Pellegrini N. (2011), *Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables*, Food Chemistry 128, p. 627-633;

Mech-Nowak A., Swiderski A., Kruczek M., Luczak I., Kostecka-Gugala A. (2012), *Content of carotenoids in roots of seventeen cultivars of Daucus carota L.*, ACTA Biochimica Polonica 59 (1), p. 139-141;

Meléndez-Martínez A.J., Escudero-Gilete M.L., Vicario I.M., Heredia F.J. (2010), *Study of the influence of carotenoid structure and individual carotenoids in the qualitative and quantitative attributes of orange juice colour*, Food Research Internacional 43, p. 1289-1296;

Mertz C., Brat P., Caris-Veyrat C., Gunata Z. (2010), *Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (Solanum betaceum Cav.)*, Food Chemistry 119, p. 653-659;

Meulebroek L.V., Vanhaecke L., De Swaef T., Steppe K., De Bradander H. (2012), *U-HPLC-MS/MS to quantify liposoluble antioxidants in red-ripe tomatoes, grown under different salt stress levels*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, p. 566-573;

Morales-de la Peña M., Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü M.A., Martín-Belloso O. (2011), *Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit juice–soymilk beverages during refrigerated storage*, Food Chemistry 129, p. 982-990;

Plaza L., Sánchez-Moreno C., De Ancos B., Elez-Martínez P., Martín-Belloso O., Cano M.P. (2011), *Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization*, LWT - Food Science and Technology 44, p. 834-839;

Rasmussen H.M., Muzhingi T., Eggert E.M.R., Johnson E.J. (2012), *Lutein, zeaxanthin, meso-zeaxanthin content in egg yolk and their absence in fish and seafood*, Journal of Food Composition and Analysis 27, p. 139-144;

Sancho L.E.G.G., Yahia E.M., González-Aguilar G.A. (2011), *Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (Carica papaya L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI*, Food Research International 44, p. 1284-1291;

Slavin M., Yu L.L. (2012), *A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans*, Food Chemistry 135, p. 2789-2795;

Vallverdú-Queralt A., Martínez-Huélamo M., Arranz-Martinez S., Miralles E., Lamuela-Raventós R.M. (2012), *Differences in the carotenoid content of ketchups and gazpachos through HPLC/ESI(Li+)-MS/MS correlated with their antioxidant capacity*, Journal of the Science of Food and Agriculture 92, p. 2043-2049;

Vallverdú-Queralt A., Oms-Oliu G., Serrano-Odriozola I., Mamela-Raventós R.M., Martín-Belloso O., Elez-Martínez P. (2013), *Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments*, Food Chemistry 136, p. 199-205;

Viñas P., Bravo-Bravo M., López-García I., Hernández-Córdoba M. (2013), *Quantification of β -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1275, p. 1-8;

Wang C.C., Chang S.C., Inbaraj B.S., Chen B.H. (2010), *Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from Lycium barbarum L. and evaluation of antioxidant activity*, Food Chemistry 120, p. 184-192;

Waramboi J.G., Gidley M.J., Sopade P.A. (2013), *Carotenoid contents of extruded and non-extruded sweetpotato flours from Papua New Guinea and Australia*, Food Chemistry 141, p.1740-1746;

Watanabe M., Musumi K., Ayugase J. (2011), *Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage*, LWT – Food Science and Technology 44, p. 1971-1975;

Whent M., Huang H., Xie Z., Lutterodt H., Yu L., Fuerst E.P., Morris C.F., Yu L., Luthria D. (2012), *Phytochemical composition, anti-inflammatory, and antiproliferative activity of whole wheat flour*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, p. 2129-2135;

Yoo K.S., Bang H., Lee E.J., Crosby K., Patil B.S. (2012), *Variation of carotenoid, sugar, and ascorbic acid concentrations in watermelon genotypes and genetic analysis*, Horticulture, Environment, and Biotechnology 53 (6), p. 552-560;

Zanfani A., Corbini G., La Rosa C., Dreassi E. (2010), *Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures*, LWT – Food Science and Technology 43, p. 67-72.

Tabela A1.1 – Métodos analíticos para a determinação de carotenoides, vitamina A e vitamina E em várias matrizes

Amostras utilizadas	Analitos	Método Analítico				Referência Bibliográfica	
		Extração	Saponificação	Fase Móvel	Fase Estacionária		Método Utilizado
Azeite virgem	Clorofila a, clorofila b, luteína, anteraxantina, violaxantina, neoxantina, β -criptoxantina	1 g + 0,001 g azeite virgem + 4 mL de <i>n</i> -hexano. Coluna lavada com 5 mL de <i>n</i> -hexano. Eluição da coluna com 3 mL de acetona; solvente evaporado num evaporador rotativo e reconstituição em 0,3 mL de acetona	-	(A) MeOH:H ₂ O (8:2, v/v) contendo 0,025% acetato de amónio e 0,05% TEA (B) MeOH:acetona (1:1, v/v)	Coluna ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	Mateos, 2006
Azeitonas	β -caroteno	2,5 g de amostra homogeneizada durante 1 min com 10 mL de <i>n</i> -hexano; centrifugação a 4000 rpm durante 5 min.	Extrato de <i>n</i> -hexano/acetato de etilo evaporado sob vácuo a 40°C e resíduo dissolvido em 10 mL de <i>i</i> -propanol/THF (7/3)	(A) ACN:MeOH (7/3) (B) <i>i</i> -propanol	Coluna RP-18 (100 x 3 mm, 2 μ m, 3 μ m)	HPLC-DAD-ESI/MS	Sagratiini, 2013
Bagas Búlgaras	Luteína, zeaxantina, licopeno, β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno	2 g de amostra + 0,2 g carbonato de magnésio + 15 mL MeOH:THF (1:1, v/v) contendo 0,1% BHT. Centrifugação durante 3 min a 3000 rpm. Recolha dos sobrenadantes; <i>pellets</i> extraídos até ficarem incolor; dissolução em ACN:MeOH:Acetato de etilo (60:20:20, v/v/v)	-	Contendo 0,1% BHT e 0,05% TEA: (A) ACN:MeOH (95:5, v/v) (B) ACN:MeOH:Acetato de etilo (60:20:20, v/v/v)	Coluna RP C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m) com coluna C18	HPLC-DAD	Marinova, 2007

Bebida láctea de sumo de fruta	<i>cis</i> -violaxantina, anteraxantina, <i>cis</i> -anteraxantina, luteína, zeaxantina, α -criptoxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno	30 mg de amostra + 50 mL carbonato de hidróxido de magnésio + 25 mg BHT e 35 mL EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v) sob N ₂ ; agitação durante 45 min. Resíduo lavado com 35 mL de EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v), filtrado 2 vezes com 12,5 mL de EtOH e uma vez com 12,5 mL de <i>n</i> -hexano (até ficar incolor). Filtrado é lavado 2 vezes com 50 mL de solução de cloreto de sódio (10%) e 3 vezes com 50 mL de H ₂ O.	Fase orgânica evaporada a 40°C; Adição de 10 mL de éter dietílico, 10 mL de KOH em MeOH (0,5 M) com 0,1% BHT e 20 mL de éter dietílico. Solução é lavada com o mesmo procedimento anterior + 10 mL etanol. Evaporação a 45°C; resíduo dissolvido com 4 mL de éter dietílico, evaporado sob N ₂ e reconstituído com 1 mL de MeOH:MTBE (70:30, v/v)	(A) MeOH:Acetato de amónio 0,1M (B) H ₂ O (C) MTBE (D) MeOH	Coluna RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	Morales-de la Peña, 2011
Cenoura	β -caroteno, carotenos, xantófilas	10 g de amostra extraídas com <i>n</i> -hexano:EtOH 96% (1:1, v/v) até ficar incolor; manter a -20°C e analisar num espaço de 72h	-	(A) H ₂ O:MeOH (1%) (B) MeOH (C) <i>n</i> -hexano:ACN (10%)	Coluna RP 18, 250mm	HPLC-DAD	Mech-Nowak, 2012
Cenouras e espinafres	Luteína, β -caroteno, α -caroteno, fitoflueno, fitoeno	0,1 g de amostra liofilizada + THF contendo 0,01% BHT. Seco sob N ₂ e reconstituído em DCM	-	(A) ACN: <i>n</i> -hexano:MeOH:DCM (2:1:1:1, v/v/v/v) (B) ACN	Coluna ODS3 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	HPLC-DAD	Mazzeo, 2011
Cereais	Luteína, β -caroteno	0,1 g de amostra + 2 mL de EtOH + 0,1 g de ácido ascórbico. Vórtex durante 1 min, banho durante 5 min.	Adição de 100 μ L de KOH 80% em H ₂ O. Sobredanates removidos, resíduo re-extraído com 2 mL de EtOH, centrifugação. Re-extração com 1 mL de EtOH. Extratos + 2 mL H ₂ O + 2 mL DCM. Evaporação sob N ₂ a 30 °C. Reconstituição com 200 μ L de sol. de acetato α -tocoferol em MeOH (IS, 50 μ m/mL)	MeOH:ACN:isopropanol Eluição de Gradiente	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	Irakli, 2011

Chás	Luteína	200 mg de amostra + 5 mL de <i>n</i> -hexano:éter dietílico (1:1), vortex durante 1 min. Deixar repousar durante 20 min a 20°C, com agitação a cada 5 min. Centrifugação a 4000 rpm, 20°C durante 10 min. 2 extrações com 5 mL <i>n</i> -hexano: éter dietílico (1:1). Evaporação do sobrenadante a 40°C. Resíduo reconstituído em 1 mL de <i>n</i> -hexano:acetona (1:1)	-	(A) ACN:H ₂ O (90%) (B) Acetato de etilo Eluição de gradiente	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); com coluna C18	HPLC-DAD	Loranty, 2010
Citrosos (diferentes espécies)	Zeaxantina, luteína, β-criptoxantina, β-citraurino, β-caroteno, α-caroteno, violaxantina, (9z)-violaxantina, mutatoxantina	300-500 g de amostra extraídas 3 vezes com MeOH e duas vezes com éter dietílico. Extratos evaporados	30% KOH:MeOH	(A) Sol. Aq. de MeOH (12%, v/v) (B) MeOH (C) MeOH:DCM (30%, v/v)	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Agócs, 2007
Coentros (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	β-caroteno	Extração com acetona fria até ficar incolor + 0,01% BHT. Extracto + éter de petróleo centrifugados.	Saponificação com sol. de KOH (10%, w/v). Extrato lavado, concentrado a 40°C em vácuo, num evaporador rotativo. Reconstituído em 1 mL de fase móvel	ACN:MeOH:Acetato de etilo (80:10:10, v/v/v)	Coluna C18 RP (259 x 4,6 mm)	HPLC-DAD	Divya, 2012

Erva chinesa (<i>Taraxacum formosanum</i>)	25 carotenoides	extração com 30 mL <i>n</i> -hexano:EtOH:acetona:tolueno (10:6:7:7, v/v/v/v). Agitação durante 1h.	Adição de 2 mL de sol. de KOH (40%) em MeOH durante 16 horas, sob azoto. Adição de 15 mL de <i>n</i> -hexano e agitação durante 10 min. Adição de 15 mL de sol. de sulfato de sódio (10%) e agitação durante 1 min. Sobrenadante + 15 mL de <i>n</i> -hexano, agitação durante 10 min (4 repetições até ficar incolor). Sobrenadante evaporado e dissolvido em 5 mL de MeOH:DCM (1:1, v/v)	(A) MeOH:ACN:H ₂ O (79:14:7, v/v/v) (B) DCM	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD-APCI/MS	Kao, 2012
Erva chinesa tradicional (<i>Lycium barbarum</i>)	10 carotenoides	10 g amostra + 50 mL de 10% de <i>n</i> -hexano:EtOH:acetona:tolueno (10:6:7:7, v/v/v/v) + 5 mL de 40% MeOH sob N ₂ , no escuro durante 6h. Extrato evaporado e dissolvido em 20 mL de DCM	-	(A) MeOH:ACN:H ₂ O (81:14:5, v/v/v) (B) DCM	Coluna YMC C30	HPLC-MS	Wang, 2010
Farinha de trigo integral	Luteína e α-tocoferol	0,10 g de amostra + 3 mL de EtOH com 0,1 % TBHQ, vortex durante 10 s e aquecimento a 85°C durante 5 min.	Adição de 0,19 mL de sol. de KOH (10M). Tubos colocados em gelo + 3 mL de NaCl (1M) + 3 mL de <i>n</i> -hexano; vortex e centrifugação. Extração com <i>n</i> -hexano repetida. Sobrenadantes lavados com carbonato de sódio e H ₂ O. Evaporação sob N ₂ e reconstituição em 0,25 mL de álcool isopropílico	MeOH:ACN:H ₂ O (22,5:48:29,5)	Coluna (150 x 3,9 mm, 3,5 µm)	HPLC-DAD	Whent, 2012

Farinhas de batata-doce extrudadas e não extrudadas	Total de carotenoides e β -caroteno	10 g de amostra + 30 mL MeOH:THF (1:1, v/v) contendo 0,1 % BHT durante 30 min a 45 rpm; centrifugação a 3000 g, 12°C, 5 min. Extrato separado com éter de petróleo (40 mL) e 300 mL H ₂ O durante 15 min. Fase superior seca com 5g de Na ₂ SO ₄ anidro; reconstituição em 1 mL de MeOH:THF	-	MeOH:THF:H ₂ O (67:27:6)	250 x 4,6 μ m, 5 μ m diâmetro interno da coluna	HPLC-DAD	Waramboi, 2013
Frutas amazônicas	60 carotenoides	Polpa extraída com acetona, transferida para éter de petróleo:éter dietílico.	Adição de KOH:MeOH (10%), durante a noite, à temperatura ambiente. Antes da transferência, o extrato é congelado (-18°C) durante 2h, seguido de filtração e lavagem com acetona fria	MeOH com 0,1% TEA:MTBE Eluição de gradiente	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 3 μ m)	HPLC-DAD-MS/MS	De Rosso, 2007
Gaspacho e ketchup	Luteína, α -caroteno, β -caroteno, <i>trans</i> -licopeno, 5- <i>cis</i> -licopeno, 9- <i>cis</i> -licopeno, 13- <i>cis</i> -licopeno	0,5 mL EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v), centrifugação a 2140 g durante 15 min, a 4°C. Reconstituição com MTBE.	-	(A) H ₂ O (B) MeOH (C) MTBE Eluição de gradiente	Coluna C30 (250 x 4,6mm, 5 μ L)	HPLC-DAD-ESI-MS/MS	Vallverdú-Queralt, 2012
Mamão	β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno	0,5 g de amostra homogeneizada em 10 mL de <i>n</i> -hexano:DCM (1:1, v/v); centrifugação a 9000 g durante 10 min a 5°C (3 vezes).	Adição de 10 mL sol. KOH (40%) em MeOH (1:1, v/v) durante 1 hora, a 50°C, com agitação a 100 rpm. Adição de 10 mL de sulfato de sódio (10%); Extrato evaporado num evaporador rotativo a 30°C; reconstituição em 2 mL de acetona	(A) MeOH (B) MTBE	Coluna RP C30 (150 x 4,6 mm, 3 μ m)	HPLC-DAD-APCI/MS	Sancho, 2011

Melância (20 genótipos)	Licopeno, luteína, violaxantina, neurosporeno, zeacaroteno, fitoflueno, fitoeno	3 g de amostra homogeneizada + 30 mL de acetona. Lavagem com acetona até ficar incolor. Adição de <i>n</i> -hexano (50 mL) e 300 mL H ₂ O. Extratos de <i>n</i> -hexano evaporados com N ₂ e reconstituídos com 0,5 mL de acetona.	-	(A) Acetato de etilo (B) ACN:H ₂ O (9:1, v/v) contendo 0,1% TEA	Coluna OSD2 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Yoo, 2012
Molhos à base de folhas de amaranto e nozes de palma	β-caroteno, luteína, violaxantina, 9- <i>cis</i> -β-caroteno, 13- <i>cis</i> -β-caroteno	Folhas de amaranto (150 mg), polpa de nozes de palma (200 mg) e água homogeneizadas 4 vezes com 10 mL EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v). Lavagem com 10 mL de NaCl a 10% e 10 mL H ₂ O destilada. Fase orgânica seca com N ₂ ; reconstituição em 2 mL de acetona.	-	(A) MeOH:H ₂ O (60:40, v/v) (B) MeOH:MTBE:H ₂ O (28,5:67,5:4, v/v/v)	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Amoussa-Hounkpatin, 2013
Nopal e marmelada de Nopal	β-caroteno, luteína, α-criptoxantina	7 g de Nopal ou 14 g de marmelada + 45 mL de acetona fria filtrados em vácuo. (2 extrações) Adição ao filtrado de 50 mL de éter de petróleo e 200 mL de H ₂ O destilada. Fase etérea lavada 4 vezes com H ₂ O. Adição de sulfato de sódio anidro. Extrato concentrado em N ₂ e reconstituído em 5 mL de acetona	-	ACN:MeOH:THF (58:35:7)	Coluna ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Leopoldo, 2012

Pasta de abacate	12 carotenoides	2 g de amostra + b-apo-8' carotenal + 10 mL acetona: banho ultrassónico durante 2 min; filtração sob vácuo. Extratos de acetona concentrados num evaporador a 37°C durante 1h.	Adição de 2 mL de sol. de KOH (9M) em EtOH:H ₂ O (50%) durante 10h. Adição de 10 mL H ₂ O destilada; 3 extrações com hexano (12 mL). Frações com <i>n</i> -hexano lavadas 10 vezes com 10 mL de H ₂ O destilada até a neutralidade. Fração com hexano concentrada a 37°C durante 1h: seco com N ₂ e reconstituído com 1 mL álcool isopropílico	(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (81:15:4, v/v) (B) MTBE:MeOH:H ₂ O (90:6:4, v/v)	Coluna RP C30 (250 x 4,5 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Jacobo-Velázquez, 2012
Peixe, frutos do mar	Luteína, Zeaxantina, criptoxantina, 5-licopeno, 9-licopeno, 13-licopeno, 15- <i>cis</i> -licopeno, <i>trans</i> -licopeno, α-caroteno, all- <i>trans</i> -caroteno, β-caroteno, 9- <i>cis</i> -β-caroteno, 13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,5-1 g amostra liofilizada + 5 mL MeOH; centrifugação a 800g durante 10 min. Adição de 5 mL THF ao resíduo; centrifugação 800 g durante 5 min; Secagem sob N ₂ de 10 mL a 4°C; reconstituição em 500 µL de EtOH	-	(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (895:3:2, v/v/v) com sol. Aq de acetado de amónio (1,5%) (B) MeOH:MTBE:H ₂ O (8:90:2, v/v/v) com Sol. aq. de Acetato de amónio (1%)	Coluna C30 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	HPLC-DAD	Rasmussen, 2012

Pimento	52 carotenoides	10 g + 1 g bicarbonato de sódio. Extração com acetona até ficar incolor. Extratos de acetona evaporados sob vácuo a 35°C até 50 mL. Concentração com 100 mL de éter dietílico. Solução de NaCl (10%) + solução Na ₂ SO ₄ (2%). Fase etérea evaporada a 30°C. Resíduo reconstituído em MeOH:MTBE (1:1, v/v)	-	(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (82:16:2, v/v/v) (B) MeOH:MTBE:H ₂ O (10:88:2, v/v/v)	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD-APCI/MS	Giuffrida, 2013
Pimentos secos	Violaxantina, β-criptoxantina, β-caroteno	1 g de amostra + 20 mL acetona fria (5°C); filtração sob vácuo. Separação com éter de petróleo e H ₂ O. Fase superior lavada várias vezes com H ₂ O; adição de sulfato de sódio anidro. Adição de éter de petróleo até perfazer 10 mL; concentração com N ₂ e reconstituição em 1 mL acetona.	-	ACN:MeOH:THF (58:35:7) Eluição Isocrática	Coluna ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Hernández-Ortega, 2012
Pimentos vermelho e amarelo	20 carotenoides	15-20 g de amostra + acetona, transferido para éter de petróleo.	Saponificação com sol. de KOH (10%), durante a noite, à temperatura ambiente. Extrato lavado e seco com sulfato de sódio. Concentração e evaporação com N ₂ . Reconstituído em acetona	ACN contendo 0,05% TEA:MeOH:Acetato de etilo Eluição de gradiente	Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	HPLC-DAD/MS	Azevedo-Meleiro, 2009
Produtos hortícolas (folhosos)	Luteína, α-caroteno, zeaxantina, β-criptoxantina, all-trans-caroteno, 13-cis-caroteno, 9-cis-β-caroteno	0,6 g de amostra aquecida a 85°C durante 5 min em EtOH com BHT (0,1% w/v)	400 µL de KOH (20%); Banho 85°C durante 10 min; banho de gelo e 3 mL de H ₂ O desionizada; Após saponificação adição de Apo-8' carotenil decanoato. 4 Extrações com n-hexano; Secagem sob árgon; Reconstituição em 1 mL (50:50) MeOH:DCM	(A) MeOH:H ₂ O (92:8, v/v) com 10 mmol/L acetato de amónio (B) MTBE	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 3 µm)	HPLC-DAD	Djuikwo, 2011

Repolho chinês	Luteína, β -caroteno, fitoeno, prolicopeno	5 g + 100 mL solução de DCM:MeOH (2:1, v/v). Centrifugação a 17000 g. 2 extrações com 100 mL de DCM. Filtração. Adição de 100 mL de <i>n</i> -hexano e 100 mL de NaCl 5%. Sobrenadante evaporado.	Precipitado dissolvido em 50 mL de éter dietílico + 5 mL de 60% KOH (w/v). Adição de 50 mL de solução <i>n</i> -hexano: éter dietílico (1:1, v/v) e NaCl (5%). Solvente orgânico tratado com NaCl (5%), evaporado e dissolvido em éter dietílico.	ACN:EtOH (8:2, v/v)	Coluna 5C18 ODS (250 x 4,6 mm)	HPLC-DAD-APCI/MS	Watanabe, 2011
Rosa mosqueta (<i>Rosa</i> spp.)	14 carotenoides	1 g de amostra liofilizada extraída em 20 mL de solução contendo EtOH (99,7%): <i>n</i> -hexano:BHT (75:25:0,01). Centrifugação a 10000 g durante 10 min	-	(A) ACN:MeOH:DCM, (80:15:5, v/v) (B) ACN:MeOH:DCM (30:20:50, v/v)	Coluna RP (250 x 4,6 mm, 4 μ m) com coluna C18	HPLC-DAD	Andersson, 2011
Semolina	Tocóis, carotenoides, retinóis	2 g de amostra + 5 mL solução pirogalol em EtOH (60 g/L); guardado a -20°C.	Sob N ₂ , adição de 2 mL de EtOH a 95 %, 1-2 mL de cloreto de sódio (10 g/L) e 2-3 mL de sol. KOH (600 g/L); banho a 70°C durante 30/45 min. Banho de gelo + 15 mL de NaCl (10 g/L). extração com 15 mL de <i>n</i> -hexano:acetato de etilo (9:1, v/v) (2 vezes). Fases orgânicas evaporadas; resíduo dissolvido em álcool isopropílico (10%) em <i>n</i> -hexano	<i>n</i> -hexano/Álcool isopropílico (5%) Eluição de gradiente	Coluna (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-UV/Vis	Fратиanni, 2012

Soja	Luteína	100 mg amostra + 3 mL EtOH com 0,1% TBHQ; vortex 10 s; banho a 85°C durante 5 min.	Adição de 0,10 mL de sol. KOH (10 mol/mL), vórtex 10s; banho a 85°C durante 10 min, vórtex 10 s. Adição de 3 mL NaCl (1 mol/L). Adição de 3 mL de hexano, vórtex 10 s; centrifugação a 1000 g durante 5 min a 4°C. (3 extrações) Sobrenadantes lavados com 5 mL Na ₂ CO ₃ 5% (w/v); centrifugação a 1000 g, durante 5 min a 4°C. Lavagem com 5 mL de H ₂ O; evaporação sob N ₂ e reconstituição em 250 mL IPA	ACN:MeOH:H ₂ O (48:22,5:29,5, v/v/v) Condições isocráticas para 40 min, seguido de 4 min de gradiente linear a 100% MeOH durante 7 min, seguido de 4 min de gradiente linear às condições iniciais	Coluna fenil (150 x 3,9 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Slavin, 2012
Sumo de cenoura, espinafres crus e cozinhados	α-caroteno, β-caroteno, violoxantina, 13- <i>cis</i> -caroteno, β-caroteno, 9- <i>cis</i> -β-caroteno	10 mL de EtOH/ <i>n</i> -hexano (4:3, v/v) + 100 µL de padrão interno (equinenona 5mg/L em acetona) e 10 mL de NaCl 10% (p/v). Centrifugação durante 10 min a 875 g. Fase superior lavada 2 vezes com 10 mL de H ₂ O destilada. Resíduo dissolvido em 1 mL de acetona	-	(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (28,5:67,5:4 (v/v/v) Eluição de gradiente	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Courraud, 2013
Sumo de laranja	34 carotenoides	extração com MeOH:acetona: <i>n</i> -hexano (25:25:50, v/v/v) contendo 0,1% de BHT. Centrifugação 2500 g durante 10 min.	Adição à fase superior de sol. de KOH (10%) em EtOH durante 1 hora; 4 lavagens com H ₂ O. Resíduo evaporado e reconstituído em 1 mL de acetona:MeOH (1:2, v/v, com 0,1% BHT)	MeOH e MTBE contendo 0,1% BHT, 0,5% TEA e H ₂ O	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	HPLC-DAD	Meléndez-Martínez, 2010

Sumo de laranja	Luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -criptoxantina, β -caroteno, α -caroteno	THF com BHT até ficar incolor. Extratos THF + éter dietílico e água salgada. Fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro.	Fase etérea reduzida a 30 mL e adição de sol. de KOH durante 16h. Adição de solução de cloreto de sódio e éter dietílico. Lavagem. Evaporação. Reconstituição em 2 mL de DCM	(A) MeOH:H ₂ O (75:25, v/v) (B) ACN:DCM:MeOH (70:5:25, v/v/v)	Coluna RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	Plaza, 2011
Sumo enriquecido de frutas	Retinol, acetato de retinil, palmitato de retinil, β -caroteno	Microextração líq-líq dispersiva 0,1-2 mL de amostra + 10 mL de H ₂ O + 2 mL MeOH contendo 150 μ L de CCl ₄ . Centrifugação durante 2 min a 3000 rpm. Resíduo evaporado sob N ₂ e reconstituído com 50 μ L de MeOH	-	MeOH:H ₂ O Eluição de Gradiente	Coluna RP C8 (150 x 46 mm, 5 μ m)	HPLC-UV-APCI/MS	Viñas, 2013
Tamarillo (<i>Solanum betaceum</i> Cav.)	36 carotenoides	3 g de puré ou 5g de néctar + 80 mL MgCO ₃ , 15 mL EtOH:n-hexano (4,3 v/v) com 0,1% BHT. Lavado com 15 mL de EtOH:n-hexano (4:3 v/v), 15 mL EtOH, 15 mL de n-hexano. Fase orgânica lavada com 40 mL de cloreto de sódio (10%) e 2 x 40 mL destilado. Fase de n-hexano seca com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado a 40°C num evaporador rotativo. Resíduo dissolvido em 500 μ L de DCM e 500 μ L de MTBE:MeOH (80:20, v/v)	Sol. KOH (10%)	(A) Acetato de amónio:H ₂ O (B) MeOH/Acetato de amónio (C) MTBE Eluição de gradiente	Coluna C30 (250 x 4,6mm, 5 μ L)	HPLC-DAD-ESI/MS	Mertz, 2010
Tomate	Licopeno, luteína, α -tocoferol, β -caroteno	2 extrações até ficar incolor com 10 mL de THF (0,01% BHT). Centrifugação a 3000 rpm durante 10 min. Evaporação sob N ₂ . Resíduo dissolvido em 3 mL de clorofórmio e diluído com fase móvel	-	MeOH:ACN:DCM (50:48:2, v/v/v) Eluição Isocrática	Coluna RP 18 (125 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-UV/Vis	Zanfini, 2010

Tomate	Licopeno, α -caroteno, β -caroteno, α -tocoferol	10 g de amostra + 200 mg de carbonato de magnésio + 35 mL EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v). Resíduo re-extraído com 35 mL EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v) e lavado com 30 mL de <i>n</i> -hexano puro. Extratos + 150 mL H ₂ O destilada + 100 mL de solução de cloreto de sódio 10% (w/v). Fase inferior tratada com 20 mL de <i>n</i> -hexano. 100 μ L de sobrenadantes diluídos com ACN:MeOH (50:50, v/v) + 0,01% BHT até fazer um volume final de 1 mL	-	(A) ACN:MeOH:Clorofórmio (50:35:15, v/v) contendo 0,01% BHT e 0,05% TEA Eluição isocrática; (B) ACN:MeOH:isopropanol Eluição de gradiente	Coluna RP C18 (100 x 2,1 mm, 1,9 μ m)	UHPLC-MS/MS	Meulebroek, 2012
Tomate	<i>all-trans</i> -licopeno, β -caroteno, luteína	25 mg de amostra extraídas com 4,5 mL de MeOH:CHCl ₃ (2,5:2, v/v) e 2,5 mL de Tampão tris (pH 7,5). Frações de CHCl ₃ secas sob N ₂ e reconstituídas em acetato de etilo	-	MeOH e MTBE Eluição de gradiente	Coluna YMC C30	HPLC-DAD	Capanoglu, 2008
Tomate (20 cultivares e linhagens diferentes)	<i>all-trans</i> -luteína, Licopeno, β -caroteno, Isómeros <i>cis</i> de β -caroteno	0,5 g de amostra seca + 10 mL de EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v), agitação a 150 rpm durante 1h, centrifugação, separação do sobrenadante, 2 extrações com 10 mL de hexano. Sobrenadantes lavados com 50 mL de H ₂ O destilada e 50 mL de sol. aq. NaCl (10%). Evaporação sob azoto do sobrenadante. Reconstituição em 1 mL com fase móvel	-	(A) MeOH:MTBE:H ₂ O (90:5:5, v/v/v) (B) MeOH:MTBE:H ₂ O (90:5:5, v/v/v) Eluição de gradiente	C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m); com coluna C18	UHPLC-DAD	Li, 2012

Tomate após tratamento com campo elétrico pulsado de moderada intensidade	10 carotenoides	0,2 g de amostra liofilizada + 5 mL de EtOH: <i>n</i> -hexano (4:3, v/v); centrifugação a 4000 rpm, a 4°C, durante 15 min. Evaporação sob N ₂ do sobrenadante. Resíduo reconstituído em 1 mL de MTBE.	-	(A) H ₂ O, MeOH (C) MTBE Eluição de gradiente	C30 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	HPLC-UV/Vis-API/MS	Vallverdú-Queralt, 2013
Trigo	Luteína, zeaxantina, β-caroteno	3 g de amostra + 15 mL de EtOH/acetona/ <i>n</i> -hexano (1:1:2). Filtração. Lavagem com 3 mL da mistura de extração. Filtrado transferido para frascos de 25 mL e adição da mistura de extração. Evaporação. Resíduo dissolvido em 2-3 mL EtOH/acetona (6:4) com 0,2% BHT	-	MeOH:H ₂ O:MTBE	Coluna C30 (150 x 3 mm, 5 μm)	HPLC-DAD	Lachman, 2003
Uvas	Isómeros de luteína, isómeros <i>cis</i> de luteína, Isómeros <i>cis</i> de β-caroteno	50 g de amostra + 25 μL BHA (12,66 mg/mL em EtOH). Homogeneização durante 5 min com 3g de carbonato de magnésio. Adição de padrão interno (100 μg de b-apo-8'-carotenal). Diluição com 40 mL de H ₂ O; extração com 40 mL de <i>n</i> -hexano:éter dietílico (1:1, v/v). Resíduo dissolvido em 2 mL MTBE:hexano (1:1, v/v)	-	(A) TEA:H ₂ O (0,05%) (B) TEA:MeOH (0,05%) (C) TEA:MTBE (0,05%) Eluição de gradiente	Coluna RP C30 (250 x 3mm, 5 μm) com coluna C30	HPLC-DAD-ESI/MS	Crupi, 2010

Vegetais (25 variedades diferentes)	Luteína, zeaxantina, β -caroteno, <i>trans</i> e <i>cis</i> - β -caroteno	10 g de amostra + 20 mL acetona fria. Adição de 10 mL padrão interno b-apo-8' carotenal e <i>n</i> -hexano (6 mg/200 mL); centrifugação a 1500 g durante 5 min. Precipitado reconstituído em 20 mL de acetona; centrifugação. Extração com acetona até ficar incolor. Sobrenadantes secos sob vácuo e a temperaturas inferiores a 30°C. Resíduo dissolvido em acetona até volume final de 20 mL	-	(A) MeOH:MTBE (85:15, v/v) (B) MeOH:MTBE (6:94, v/v)	Coluna C30 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)	HPLC-DAD	Kao, 2012
-------------------------------------	---	---	---	--	--------------------------------------	----------	-----------

Anexo 2

Tabela 28 - Valores críticos utilizados no Teste de Cochran (1 grau de liberdade), $\alpha=0,05$ (Fearn, 2001)

k	vx											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,5700	0,5400

Anexo 3

Tabela 29 - Fatores F1 e F2 utilizados no teste de homogeneidade (Fearn, 2001)

m	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
F1	1,59	1,6	1,62	1,64	1,67	1,69	1,72	1,75	1,79	1,83	1,88	1,94	2,01	2,1
F2	0,57	0,59	0,62	0,64	0,68	0,71	0,75	0,8	0,86	0,93	1,01	1,11	1,25	1,43

Anexo 4

A base de dados foi construída com base nas seguintes referências bibliográficas:

Agostini-Costa T.S., Wondracek D.C., Rocha W.S., da Silva D.B. (2012), *Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of pereskia aculeata miller*, Revista Brasileira De Fruticultura 34 (1), p. 234-238;

Assunção R.B., Mercadante A.Z. (2003), *Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (anacardium occidentale L.)*, Journal of Food Composition and Analysis 16 (6), p. 647-657;

Atienza S.G., Ballesteros J., Martín A., Hornero-Méndez D. (2007), *Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (xTritordeum ascherson et graebner) and durum wheat accessions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (10), p. 4244-4251;

Azevedo-Meleiro C.H., Rodriguez-Amaya D.B. (2009), *Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS*, Journal of Separation Science 32, p. 3652-3658;

Blessington T., Nzaramba M.N., Scheuring D.C., Hale A.L., Reddivari L., Miller Jr, J.C. (2010) *Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics*, American Journal of Potato Research 87 (6), p. 479-49;

Bulux J., De Serrano J.Q., Perez R., Rivera C., Solomons N.W. (1998), *The plasma β -carotene response to a single meal of carrots in guatemalan schoolchildren*, International Journal of Food Sciences and Nutrition 49 (3), p. 173-179;

Burgos G., Amoros W., Salas E., Muñoa L., Sosa P., Díaz C., Bonierbale M. (2012), *Carotenoid concentrations of native andean potatoes as affected by cooking*, Food Chemistry 133 (4), p. 1131-1137;

Cardoso P.C., Tomazini A.P.B., Stringheta P.C., Ribeiro S.M.R., Pinheiro-Sant'Ana H.M. (2011), *Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in brazil*, Food Chemistry 126 (2), p. 411-416;

Carvalho L.M.J., Gomes P.B., Godoy R.L.D.O., Pacheco S., Monte P.H.F., Carvalho J.L.V., Ramos S.R.R. (2012), *Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*cucurbita moschata* duch): A preliminary study*, Food Research International 47 (2), p. 337-340;

Carvalho L.M.J., Oliveira A.R.G., Godoy R.L.O., Pacheco S., Nutti M.R., De Carvalho J.L.V., Fukuda W.G. (2012), *Retention of total carotenoid and β -carotene in yellow sweet cassava (*manihot esculenta* crantz) after domestic cooking*, Food and Nutrition Research 56; p. 1-8;

Ceballos H., Morante N., Sánchez T., Ortiz D., Aragón I., Chávez A.L., Dufour D. (2013), *Rapid cycling recurrent selection for increased carotenoids content in cassava roots*, Crop Science 53 (6), p. 2342-2351;

Chisté R.C., Mercadante A.Z. (2012), *Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the amazonian fruit caryocar villosum*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60 (23), p. 5884-5892;

Collera-Zúñiga O., Jiménez F.G., Gordillo R.M. (2005), *Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of capsicum annuum L*, Food Chemistry 90 (1-2), p. 109-114;

Costa T.S.A., Wondracek D.C., Lopes R.M., Vieira R.F., Ferreira F.R. (2010), *Carotenoids composition of canistel (*pouteria campechiana* (kunth) baehni)*, Revista Brasileira De Fruticultura 32 (3), p. 903-906;

Demir T. (2013), *Determination of carotenoid, organic acid and sugar content in some sweet cherry cultivars grown in sakarya, turkey*, Journal of Food, Agriculture and Environment 11 (2), p. 73-75;

Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2008), *Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production*, Food Chemistry 109, p. 815-824;

Faria A.F., Hasegawa P.N., Chagas E.A., Pio R., Purgatto E., Mercadante A.Z. (2009), *Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from brazil*, Journal of Food Composition and Analysis 22 (3), p. 196-203;

Faria A.F., Rosso V.V., Mercadante A.Z. (2009), *Carotenoid composition of jackfruit (artocarpus heterophyllus), determined by HPLC-PDA-MS/MS*, Plant Foods for Human Nutrition 64 (2), p. 108-115;

García M.I., Lozano M., Espinosa V.M., Ayuso M.C., Bernalte M.J., Vidal-Aragón M.C., Pérez M.M. (2007), *Agronomic characteristics and carotenoid content of five Bola-type paprika red pepper (Capsicum annuum L.) cultivars*, Scientia Horticulturae 113, p. 202-207;

López A., Javier G.A., Fenoll J., Hellín P., Flores P. (2014), *Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types*, Journal of Food Composition and Analysis 33, p. 39-48;

Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J. (2003), *A routine high performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, p. 4219-4224;

Murillo E., Meléndez-Martínez A.J., Portugal F. (2010), *Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin*, Food Chemistry 122, p. 167-172;

Oliveira D.S., Aquino P.P., Proença R.P.C.R., Pinheiro-Sant'Ana H.M. (2011), *Vitamina C, carotenoids, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais*, Maringá 33 (1), p. 89-98;

Rosso V.V., Mercadante A.Z. (2007), *Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (13), p. 5062-5072;

Sá M.C., Rodriguez-Amaya D.B. (2003), *Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants*, Food Chemistry, 83 (4), p. 595-600;

Sentanin M.A., Rodriguez- Amaya D.B. (2007), *Teores de carotenóides em mamão e pêssgo determinados por cromatografia líquida de alta eficiência*, Ciência e Tecnologia de Alimentos 27 (1), p. 13-19;

Vallverdú-Queralt A., Alvarenga J.F.R., Estruch R., Lamuela-Raventos R.M. (2013), *Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito*, Food Chemistry 141, p. 3365-3372;

Wondracek D.C., Faleiro F.G., Sano S.M., Vieira R.F., Agostini-Costa T.S. (2011), *Composição de carotenoides em passifloras do cerrado*, Revista Brasileira de Friticultura 33 (4), p. 1222-1228;

Base de dados construída no âmbito do projeto *Iberocarot*

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	Quality assessment	α -carotene	β -carotene	β -cryptoxanthin	lycopene	lutein	zeaxanthin
American gooseberry	ora-pro-nobis / Brazil	Pereskia aculeata Mill	Fruit	reddish-orange	Raw/Frozen	Without	ripe	Conventional	SAP/HPLC		2270 \pm 60 (nw=3)		220 \pm 20 (nw=3)		650 \pm 40 (nw=3)	
cashew apple (pulp)	caju / Brazil	Anacardium occidentale L.	Fruit	yellow	Unknown	With	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	Precision / Recovery	31,81 \pm 12,82 (nb=4; nl=5)		35,87 \pm 10,88 (nb=4; nl=5)		4,20 \pm 2,01 (nb=4 ;	
cashew apple (concentrated)	caju / Brazil	Anacardium occidentale L.	Fruit	yellow	Unknown	With	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	Precision / Recovery	14,99 \pm 1,95 (nb=5 ; nl=5)		6,85 \pm 3,56 (nb=5; nl=5)		(nb=5 ; nl=5)	
cashew apple (nectar)	caju / Brazil	Anacardium occidentale L.	Fruit	yellow	Unknown	With	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	Precision / Recovery	1,08 \pm 0,55 (nb=1 ; nl=5)		1,37 \pm 0,57 (nb=1; nl=5)		(nb=1 ; nl=5)	
cashew apple (ready-to-drink)	caju / Brazil	Anacardium occidentale L.	Fruit	yellow	Unknown	With	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	Precision / Recovery	1,65 \pm 1,64 (nb=1 ; nl=5)		1,81 \pm 0,95 (n=1 ; nl=5)		0,56 \pm 0,18 (nb=1 ;	
cashew apple (Sweetened)	caju / Brazil	Anacardium occidentale L.	Fruit	yellow	Unknown	With	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	Precision / Recovery	5,41 \pm 1,15 (nb=1 ; nl=5)		14,21 \pm 4,97 (nb=1 ; nl=5)		3,54 \pm 0,74 (nb=1 ;	
tritordeum	Spain	Tritordeum Ascherson et	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Indoor/under glass	UNSAP/HPLC						290 (nl=24) (max-590;	
tritordeum	Spain	Ascherson et Graebner (HT2)	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Indoor/under glass	UNSAP/HPLC						(max-480; min-90) 90 (nl=7)	
durum wheat	Spain		vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Indoor/under glass	UNSAP/HPLC						(max-140; min 60)	
Potato	Texas	mixture of genotypes Solanum phureja	vegetable	white	Unknown	With	ripe	Domesticated / cultivated /	UNSAP/HPLC						10 \pm 20 81 \pm 8	
Andean potato	Peru	[705821]	vegetable	light yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC			20 \pm 2 (nw=3)			(nw=3)	n.d
Andean potato	Peru	Solanum phureja [705821]	vegetable	light yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC			26 \pm 3 (nw=3)			(nw=3)	n.d.
Andean potato	Peru	[705172]	vegetable	light yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC			27 \pm 4 (nw=3)			(nw=3)	n.d.
Andean potato	Peru	Solanum phureja [705172]	vegetable	light yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC			32 \pm 3 (nw=3)			(nw=3)	n.d.
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix [704393]	vegetable	intermediate yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC			7,4 \pm 0,3 (nw=3)			180 \pm 10 (nw=3)	17 \pm 1 (nw=3)

Name (english)	α - cryptoxanthin	VIOLAXANTHIN	ANTHERAXANTHIN	Auroxanthin	Zeinoxanthin	ζ -Carotene	β - Carotene+phytofluene	9-cis+13-cis-b- Carotene	<i>all-E</i> β -carotene	Z,Z- β - carotene	Z,Z- β - cryptoxant	Z,Z- lycopene
American gooseberry	270 \pm 20 (nw=3)								3430 \pm 60 (nw=3)	280 \pm 10 (nw=3)		
cashew apple (pulp)				0,62 \pm 0,42 (nb=4 ; nl=5)	7,46 \pm 1,82 (nb=4 ; nl=5)	2,60 \pm 0,85 (nb=4 ; nl=5)	77,82 \pm 27,81 (nb=4 ; nl=5)	16,11 \pm 5,39 (nb=4 ; nl=5)			10,48 \pm 2,12 (nb=4 ; nl=5)	
cashew apple (concentrated)				0,23 \pm 0,14 (nb=5 ; nl=5)	3,11 \pm 2,23 (nb=5 ; nl=5)	1,09 \pm 0,56 (nb=5 ; nl=5)	47,14 \pm 6,18 (nb=5 ; nl=5)	14,22 \pm 2,15 (nb=5 ; nl=5)			3,27 \pm 0,85 (nb=5 ; nl=5)	
cashew apple (nectar)				0,15 \pm 0,04 (nb=1 ; nl=5)	0,35 \pm 0,05 (nb=1 ; nl=5)		3,26 \pm 1,21 (nb=1 ; nl=5)	0,93 \pm 0,29 (nb=1 ; nl=5)			0,37 \pm 0,03 (nb=1 ; nl=5)	
cashew apple (ready-to-drink)				0,11 \pm 0,04 (nb=1 ; nl=5)	0,37 \pm 0,12 (nb=1 ; nl=5)		5,54 \pm 3,15 (nb=1 ; nl=5)	1,96 \pm 1,77 (nb=1 ; nl=5)			0,56 \pm 0,17 (nb=1 ; nl=5)	
cashew apple (Sweetened)				0,58 \pm 0,11 (nb=1 ; nl=5)	3,23 \pm 0,82 (nb=1 ; nl=5)	0,55 \pm 0,00 (nb=1 ; nl=5)	10,44 \pm 2,29 (nb=1 ; nl=5)	2,44 \pm 0,48 (nb=1 ; nl=5)			2,72 \pm 0,97 (nb=1 ; nl=5)	
tritordeum												
tritordeum												
durum wheat												
Potato												
Andean potato		38 \pm 5 (nw=3)	25 \pm 3 (nw=3)									
Andean potato		11 \pm 4 (nw=3)	16 \pm 4 (nw=3)									
Andean potato		57 \pm 5 (nw=3)	28 \pm 2 (nw=3)									
Andean potato		10 \pm 4 (nw=3)	12 \pm 1 (nw=3)									
Andean potato		294 \pm 19 (nw=3)	168 \pm 14 (nw=3)									

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel / skin / bones	Ripeness	Production	Method	Quality assessment	β -carotene	lycopene	lutein	zeaxanthin	VIOLAXANTHIN	ANTHERAXANTHIN
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix (704393)	vegetable	intermediate yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		n.d.		185 ± 14 (nw=3)	41 ± 3 (nw=3)	78 ± 10 (nw=3)	71 ± 15 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix (701862)	vegetable	intermediate yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		12 ± 2 (nw=3)		290 ± 22 (nw=3)	n.d.	432 ± 30 (nw=3)	63 ± 8 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix (701862)	vegetable	intermediate yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		9,2 ± 0,6 (nw=3)		253 ± 5 (nw=3)	21 ± 1 (nw=3)	36 ± 7 (nw=3)	n.d.
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix (702472)	vegetable	deep yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		7,3 ± 0,9 (nw=3)		77 ± 5 (nw=3)	562 ± 16 (nw=3)	59 ± 5 (nw=3)	172 ± 7 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum goniocalix (702472)	vegetable	deep yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		n.d.		73 ± 6 (nw=3)	555 ± 13 (nw=3)	n.d.	45 ± 4 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum phureja (705799)	vegetable	deep yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		15 ± 2 (nw=3)		105 ± 21 (nw=3)	588 ± 32 (nw=3)	72 ± 10 (nw=3)	310 ± 17 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum phureja (705799)	vegetable	deep yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		10 ± 2 (nw=3)		113 ± 23 (nw=3)	571 ± 33 (nw=3)	34 ± 7 (nw=3)	163 ± 63 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum phureja (704218)	vegetable	deep yellow	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		n.d.		96 ± 6 (nw=3)	1048 ± 61 (nw=3)	38 ± 8 (nw=3)	190 ± 4 (nw=3)
Andean potato	Peru	Solanum phureja (704218)	vegetable	deep yellow	Boiled	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC		n.d.		96 ± 8 (nw=3)	1013 ± 55 (nw=3)	n.d.	n.d.
Persimmon	Dióspiro /Brazil	Diospyros kaki L., var. Rama Forte	Fruit	unknown	Raw	With	Unknown	Conventional		recovery/ linear range	645,60 ± 42,58 (nw=6)	453,27 ± 63,32				
Persimmon	Dióspiro /Brazil	Diospyros kaki L., var. Rama Forte	Fruit	unknown	Raw	With	Unknown	Organic		recovery/ linear range	703,24 ± 86,64 (nw=6)	567,87 ± 269,59				
Acerola	Acerola / Brazil	Malpighia puniceifolia L., var. Olivier	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional		recovery/ linear range	6130,24 ± 559,17	n.d.				
Acerola	Acerola / Brazil	Malpighia puniceifolia L., var. Olivier	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Organic		recovery/ linear range	2486,38 ± 272,48	n.d.				
Strawberry	Morango /Brazil	Fragaria vesca L., var. Oso Grande	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional		recovery/ linear range	53,02 ± 2,15 (nw=6)	n.d.				
Strawberry	Morango /Brazil	Fragaria vesca L., var. Oso Grande	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Organic		recovery/ LOD / LOQ	54,08 ± 7,71 (nw=6)	n.d.				

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name (including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	α -carotene	β -carotene	lutein	zeaxanthin	NEOXANTH IN	VIOLAXANTHI N	α - CRYPTOXANTHI
Cassava	Mandioca / Brazil	Manihot esculenta	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		199 ± 9 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	Manihot esculenta	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		329 ± 6 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	esculenta Crantz / 1668 -	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	cultivated / aquaculture	UNSAPI/HP LC		211± 2 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	Manihot esculenta	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		238 ± 14 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	Manihot esculenta	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		284 ± 35 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	esculenta Crantz / Hibrido	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	cultivated / aquaculture	UNSAPI/HP LC		811 ± 6 (nv=3)					
Cassava	Mandioca / Brazil	Manihot esculenta	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		537 ± 51 (nv=3)					
Cassava roots	Mandioca / Colombia	Manihot esculenta	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		230 (n=288) (max=990)					
Cassava roots	Mandioca / Colombia	Manihot esculenta	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		550 (n=173) (max=1280)					
Cassava roots	Mandioca / Colombia	Manihot esculenta	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		490 (n=345) (max=1030)					
Cassava roots	Mandioca / Colombia	esculenta Crantz (2010)	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	cultivated / aquaculture	UNSAPI/HP LC		980 (n=490) (max=1910)					
Cassava roots	Mandioca / Colombia	Manihot esculenta	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		850 (n=332) (max=1500)					
Cassava roots Caryocar	Mandioca / Colombia	Manihot esculenta	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAPI/HP LC		860 (n=415) (max=1620)					
villosum fruits	piquiá / Brazil	villosum	Fruit	yellow	Freeze-dried	With	Unknown	Conventional	UNSAPI/HP LC-MS/MS							
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var.	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAPI/HP LC reverse	157,92	1571,68	-	322,61	18,93	1090,4	397,06
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var.	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAPI/HP LC reverse	85,85	1210,04	-	127,09	159,28	892,32	151,42

Name (english)	b-CRYPTOXANTHI	CAPSANTHIN	CAPSORUBIN	ANTHERAXANTHIN	Latoxanthin	Cucurbitaxanthin B	Mutatoxanthan 2	Mutatoxanthan 1	Cryptocapsin	13-Z-β-carotene	9-Z-β-carotene	9-cis-neoxanthin
Cassava										52 ± 2 (nw=3)	47 ± 2 (nw=3)	
Cassava										51 ± 1 (nw=3)	112 ± 5 (nw=3)	
Cassava										29 ± 1 (nw=3)	81 ± 1 (nw=3)	
Cassava										42 ± 27 (nw=3)	25 ± 2 (nw=3)	
Cassava										47 ± 6 (nw=3)	79 ± 12 (nw=3)	
Cassava										50 ± 1 (nw=3)	35 ± 1 (nw=3)	
Cassava										37 ± 2 (nw=3)	76 ± 2 (nw=3)	
Cassava roots												
Cassava roots												
Cassava roots												
Cassava roots												
Cassava roots												
Cassava roots Caryocar villosum fruits												80 ± 20 (nw=3)
Capsicum annuum fruits	729,44	728,69	163,18	traces	417,36	789,6	22,56	24,816	18,05			
Capsicum annuum fruits	644,23	851,76	23,66	477,93	105,46	-	20,96	20,28	676			

Name (english)	9-cis-violaxanthin	9-cis-mutatoxanthin	9-cis-antheraxanthin	9-cis-Capsanthin	15-cis-Zeaxanthin	9-cis-Zeaxanthin	Sintaxanthin	9'-cis-neoxanthin	all-E-β-carotene	all-E-lutein	all-trans-neoxant	all-trans-violaxant	all-E-antherax	all-E-zeaxant
Cassava									100 ± 5 (nw=3)					
Cassava									167 ± 1 (nw=3)					
Cassava									101 ± 1 (nw=3)					
Cassava									171 ± 11 (nw=3)					
Cassava									158 ± 16 (nw=3)					
Cassava									727 ± 5 (nw=3)					
Cassava									423 ± 47 (nw=3)					
Cassava roots														
Cassava roots														
Cassava roots														
Cassava roots														
Cassava roots														
Caryocar villosum fruits	40 ± 10 (nw=3)	60 ± 50 (nw=3)	60 ± 20 (nw=3)					90 ± 20 (nw=3)	70 ± 4 (nw=3)	90 ± 20 (nw=3)	230 ± 60 (nw=3)	110 ± 20 (nw=3)	340 ± 60 (n=3)	290 ± 30 (nw=3)
Capsicum annuum fruits				759,52	-	-								
Capsicum annuum fruits				676	323,8	33,8								

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	α-carotene	β-carotene	lutein	zeaxanthin	total carotenoid	PHYTOENE	PHYTOFLUENE
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var. Mulato	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC reverse	215,75	1078,76	63,71	257,74			
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var. Ancho	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC normal	1037,76	1481,44	traces	648,98			
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var. Guajillo	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC normal	517,14	1095,12	traces	298,12			
Capsicum annuum fruits	Chile / Mexico	Capsicum annuum L., var. Mulato	Fruit	unknown	Dried	Unknown	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC normal	615,4	796,4	1,45	2,17			
Canistel	Canistel / Central America, Mexico	Pouteria campechiana	Fruit	orange-yellow	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/OCC		710 ± 70 (nw=2)					650 ± 10 (nw=2)
Landrace pumpkins	Abóbora / Brazil	Cucurbita moschata Duch/ A		orange-yellow	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAP/HPLC	6706 ± 33 (nw=3; nl=5)						
Landrace pumpkins	Abóbora / Brazil	Cucurbita moschata Duch/ B		orange-yellow	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSAP/HPLC	7299 ± 11 (nw=3; nl=5)						
Jackfruit	Jaca / Brazil	Artocarpus heterophyllus/ Batch	Fruit	cream	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC-MS/MS							
Jackfruit	Jaca / Brazil	Artocarpus heterophyllus/ Batch	Fruit	yellow	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC-MS/MS							
Jackfruit	Jaca / Brazil	Artocarpus heterophyllus/ Batch	Fruit	yellow	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC-MS/MS							
Loquat	Nêspera/ Brazil	Eriobotrya japonica Lindl. (Centenária)	Fruit	orange	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC-MS/MS						25,3 (nw=2)	
Loquat	Nêspera/ Brazil	Eriobotrya japonica Lindl. (Mizauto)	Fruit	orange	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC-MS/MS						22,0 (nw=2)	
Loquat	Nêspera/ Brazil	Eriobotrya japonica Lindl. (Mizuho)	Fruit	orange-yellow	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC-MS/MS						22,1 (nw=2)	
Loquat	Nêspera/ Brazil	Eriobotrya japonica Lindl. (Mizumo)	Fruit	orange	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC-MS/MS						34,0 (nw=2)	
Loquat	Nêspera/ Brazil	Eriobotrya japonica Lindl. (Néctar de	Fruit	yellow	Raw	With	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC-MS/MS						n.d.	

Name (english)	NEOXANTHIN	VIOLAXANTHIN	α-CRYPTOXANTHIN	β-CRYPTOXANTHIN	CAPSANTHIN	CANTAXANTHIN	CAPSORUBIN	ANTHERAXANTHIN	Latoxanthin	Cucurbitaxanthin A	Cucurbitaxanthin B	Cycloviolaxanthin
Capsicum annuum fruits	traces	1592,8	52,13	441,64	810,88	56,47	304,08	traces	110,77	-	810,88	-
Capsicum annuum fruits	405,6	traces	-	-	437,66	-	105,28	traces	53,39	-	437,66	-
Capsicum annuum fruits	429,33	traces	730,08	299,47	-	-	20,28	traces	59,49	-	traces	77,74
Capsicum annuum fruits		803,64	512,59	23,89	3,62	-	48,51	traces	214,3	199,1	3,62	20,99
Canistel												
Landrace pumpkins												
Landrace pumpkins												
Jackfruit												
Jackfruit												
Jackfruit												
Loquat												
Loquat												
Loquat												
Loquat												
Loquat												

Name (english)	Mutatoxanthan	Mutatoxanthan 2	Cryptocapsin	Crytoflavin	15-Z-β-carotene	13-Z-β-carotene	9-Z-β-carotene	9-cis-neoxanthin	9-cis-violaxanthin	cis-antheraxanthin	Trans-ζ-Carotene
Capsicum annuum fruits	-	89,05	44,89	-							
Capsicum annuum fruits	traces	-	-	606,11							
Capsicum annuum fruits	231,19	-	464,41	279,19							
Capsicum annuum fruits	528,52	-	407,61	253,4							
Canistel											910 ± 30 (nw=2)
Landrace pumpkins						367 ± 32 (nw=3; nl=5)	234 ± 35 (nw=3; nl=5)				
Landrace pumpkins						184 ± 14 (nw=3; nl=5)	97 (nw=3; nl=5)				
Jackfruit					n.d.	0,70 ± 0,09 (nw=2)	0,36 ± 0,03 (nw=2)	3,19 ± 0,15 (nw=2)	1,79 ± 0,02 (nw=2)	1,64 ± 0,14 (nw=2)	
Jackfruit					n.d.	3,79 ± 0,17 (nw=2)	0,99 ± 0,09 (nw=2)	5,28 ± 0,29 (nw=2)	4,89 ± 0,13 (nw=2)	0,87 ± 0,02 (nw=2)	
Jackfruit						0,63 ± 0,01 (nw=2)	2,19 ± 0,02 (nw=2)	0,93 ± 0,01 (nw=2)	12,92 ± 0,12 (nw=2)	15,54 ± 0,37 (nw=2)	0,98 ± 0,05 (nw=2)
Loquat					2,0 (nw=2)	19,4 (nw=2)	6,7 (nw=2)		2,4 (nw=2)		
Loquat					4,8 (nw=2)	42,0 (nw=2)	17,3 (nw=2)		5,4 (nw=2)		
Loquat					3,0 (nw=2)	45,9 (nw=2)	18,0 (nw=2)		7,1 (nw=2)		
Loquat					3,4 (nw=2)	36,2 (nw=2)	12,3 (nw=2)		12,8 (nw=2)		
Loquat					0,7 (nw=2)	5,0 (nw=2)	1,6 (nw=2)		2,3 (nw=2)		

Name (english)	violaxanthin+neoxanthin	Luteoxanthin	cis-Luteoxanthin	cis-zeinoxanthin	all-trans-violaxanthin + 9-cis-neoxanthin	13'-cis-b-cryptoxanthin	9-cis-Capsanthin	all-E- α -carotene	all-E- β -carotene	all-E- β -cryptoxanthin	all-E- α -cryptoxanthin	all-E-lutein
Capsicum annuum fruits		152,04					718,93					
Capsicum annuum fruits		200,78					1331,04					
Capsicum annuum fruits		-					532,69					
Capsicum annuum fruits		199,1					8,69					
Canistel	19600 \pm 500 (nw=2)											
Landrace pumpkins								24422 \pm 963 (nw=3; nl=5)				
Landrace pumpkins								14195 \pm 39 (nw=3; nl=5)				
Jackfruit			n.d.	n.d.				n.d.	8,33 \pm 1,29 (nw=2)	0,67 \pm 0,04 (nw=2)	n.d.	10,36 \pm 1,10 (nw=2)
Jackfruit			0,78 \pm 0,02 (nw=2)	2,10 \pm 0,05 (nw=2)				2,06 \pm 0,12 (nw=2)	33,32 \pm 1,48 (nw=2)	1,22 \pm 0,06 (nw=2)	n.d.	55,61 \pm 3,18 (nw=2)
Jackfruit								1,26 \pm 0,03 (nw=2)	45,12 \pm 0,65 (nw=2)			35,80 \pm 0,72 (nw=2)
Jackfruit			n.d.	n.d.						1,76 \pm 0,01 (nw=2)	1,24 \pm 0,10 (nw=2)	
Loquat					9,3 (nw=2)	5,8 (nw=2)			858,5 (nw=2)	278,4 (nw=2)		3,9 (nw=2)
Loquat					12,9 (nw=2)	15,1 (nw=2)			980,9 (nw=2)	480,2 (nw=2)		12,5 (nw=2)
Loquat					22,7 (nw=2)	20,1 (nw=2)			1090,7 (nw=2)	557,6 (nw=2)		13,5 (nw=2)
Loquat					28,2 (nw=2)	16,6 (nw=2)			1441,5 (nw=2)	715,2 (nw=2)		7,9 (nw=2)
Loquat					4,4 (nw=2)	4,0 (nw=2)			38,1 (nw=2)	54,8 (nw=2)		6,4 (nw=2)

Name (english)	all-trans-neoxanthin	all-trans-neochrome	all-trans-luteoxanthi	all-trans-Zeinoxanthi	all-trans-phytofluen	all-E-zeaxanthin	Z,Z-β-carotene	Z,Z-zeaxanthin	cis-phytofluen
Capsicum annuum fruits							-	-	
Capsicum annuum fruits							-	631,68	
Capsicum annuum fruits							290	-	
Capsicum annuum fruits							637,12	129,6	
Canistel									
Landrace pumpkins									
Landrace pumpkins									
Jackfruit	6,33 ± 0,15 (nw=2)	n.d.	0,77 ± 0,02 (nw=2)	n.d.		n.d.			
Jackfruit	5,01 ± 0,53 (nw=2)	2,05 ± 0,30 (nw=2)	2,71 ± 0,07 (nw=2)	2,20 ± 0,03 (nw=2)		2,23 ± 0,13 (nw=2)			
Jackfruit	17,13 ± 1,53 (nw=2)	n.d.	2,38 ± 0,10 (nw=2)	2,74 ± 0,01 (nw=2)		n.d.			
Loquat	n.d.	0,3 (nw=2)			1,7 (nw=2)				12,5 (nw=2)
Loquat	n.d.	1,5 (nw=2)			1,9 (nw=2)				8,5 (nw=2)
Loquat	n.d.	1,9 (nw=2)			3,3 (nw=2)				10,1 (nw=2)
Loquat	n.d.	6,4 (nw=2)			3,4 (nw=2)				19,3 (nw=2)
Loquat	0,2 (nw=2)	1,2 (nw=2)			0,7 (nw=2)				n.d.

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	lutein	total carotenoid	NEOXANTHIN	VIOLAXANTHIN
Buriti	Brazil (Amazonian region)	Mauritia vinifera	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			51387		
Mamey	Brazil (Amazonian region)	Mammea americana	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			6253		
Marimari	Brazil (Amazonian region)	Geoffrola striata	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			3798		
Palm oil	Brazil (Amazonian region)	Elaeis guineensis		unknown	Unknown	Not applicable	Not applicable	Unknown	SAP/HPLC-MS/MS			12903		
Peach Palm	Brazil (Amazonian region)	Bactrys basipaes	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			19766		
Physalis	Brazil (Amazonian region)	Physalis angulata	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			8089		
Tucuma	Brazil (Amazonian region)	Astrocaryum aculeatum	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC-MS/MS			6265		
Broccoli	Bróculos / Brazil	(Restaurant A)	vegetable	green	Boiled	Without	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	1890 \pm 570 (nl=5)	3460 \pm 830 (nl=5)		830 \pm 270 (nl=5)	680 \pm 150 (nl=5)
Broccoli	Bróculos / Brazil	(Restaurant B)	vegetable	green	Boiled	Without	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	2220 \pm 420 (nl=5)	3960 \pm 510 (nl=5)		740 \pm 280 (nl=5)	310 \pm 440 (nl=5)
Broccoli	Bróculos / Brazil	(Restaurant E)	vegetable	green	Boiled	Without	Unknown	Unknown	UNSAP/HPLC	1570 \pm 350 (nl=5)	3110 \pm 520 (nl=5)		670 \pm 190 (nl=5)	600 \pm 210 (nl=5)
Broccoli	Bróculos / Brazil	(Restaurant A)	vegetable	green	stir-fried	Without	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	1140 \pm 370 (nl=5)	2760 \pm 270 (nl=5)		740 \pm 150 (nl=5)	500 \pm 200 (nl=5)
Broccoli	Bróculos / Brazil	(Restaurant E)	vegetable	green	stir-fried	Without	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	2010 \pm 650 (nl=5)	3790 \pm 1290 (nl=5)		650 \pm 150 (nl=5)	410 \pm 260 (nl=5)
Endive	Brazil	(Restaurant C)	vegetable	unknown	stir-fried	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	1240 \pm 370 (nl=5)	2340 \pm 500 (nl=5)		700 \pm 200 (nl=5)	680 \pm 150 (nl=5)
Green bean	Feijão Verde / Bra	(Restaurant A)	vegetable	green	Boiled	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	130 \pm 20 (nl=5)	220 \pm 50 (nl=5)		Trace	Trace
Green bean	Feijão Verde / Bra	(Restaurant B)	vegetable	green	Boiled	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	160 \pm 30 (nl=5)	240 \pm 40 (nl=5)		Trace	Trace
Green bean	Feijão Verde / Bra	(Restaurant C)	vegetable	green	Boiled	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	200 \pm 30 (nl=5)	290 \pm 70 (nl=5)		Trace	Trace

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	α -carotene	β -carotene	β -cryptoxanthin	lutein	zeaxanthin	NEOXANTHIN	VIOLAXANTHIN
Green bean	Feijão Verde / Brazil	(Restaurant A)	vegetable	green	stir-fried	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		170 ± 60 (nl=5)		290 ± 90 (nl=5)		Trace	Trace
Green bean	Feijão Verde / Brazil	(Restaurant B)	vegetable	green	stir-fried	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		180 ± 60 (nl=5)		280 ± 50 (nl=5)		Trace	Trace
Green bean	Feijão Verde / Brazil	(Restaurant C)	vegetable	green	stir-fried	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		180 ± 70 (nl=5)		250 ± 100 (nl=5)		Trace	Trace
Kale	Couve /Brazil	(Restaurant A)	vegetable	unknown	stir-fried	Without	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		2280 ± 420 (nl=5)		3500 ± 450 (nl=5)		790 ± 240 (nl=5)	880 ± 440 (nl=5)
Kale	Couve /Brazil	(Restaurant B)	vegetable	unknown	stir-fried	Without	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		2240 ± 420 (nl=5)		2860 ± 490 (nl=5)		490 ± 210 (nl=5)	280 ± 160 (nl=5)
Kale	Couve /Brazil	(Restaurant D)	vegetable	unknown	stir-fried	Without	Unknown	Unknown	SAP/HPLC		240 ± 230 (nl=5)		310 ± 370 (nl=5)		630 ± 270 (nl=5)	530 ± 370 (nl=5)
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (Karakiraz)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1027 (nw=3)	1036 (nw=3)	332 (nw=3)		150 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (Napoleon)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1278 (nw=3)	1012 (nw=3)	46 (nw=3)		40 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (Lambert)	Fruit	red	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1099 (nw=3)	1116 (nw=3)	158 (nw=3)		121 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (Churchill)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1511 (nw=3)	1165 (nw=3)	134 (nw=3)		162 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (Hasan Kazak)	Fruit	red	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1627 (nw=3)	1536 (nw=3)	132 (nw=3)		150 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (z0900- 1)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1278 (nw=3)	1012 (nw=3)	46 (nw=3)		40 (nw=3)		
Sweet cherry	Turkey	Prunus avium (z0900- 2)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	ripe	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	1299 (nw=3)	1016 (nw=3)	58 (nw=3)		21 (nw=3)		
Apple	Maçã /Portugal (Mangualde)	Malus domestica Borkh var. bravo	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC				17 (nw=2)	1,9 (nw=2)		
Apple	Maçã /Portugal (Alcobaça)	Malus domestica Borkh var. golden	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC				3,2 (nw=2)	ND		
Apple	Maçã /Portugal (Cova da Beira)	Malus domestica Borkh var. golden	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC				1,6 (nw=2)	1,8 (nw=2)		

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	lycopene	lutein	zeaxanthin	all-E- α -carotene	all-E- β -carotene	all-E- β -cryptoxanthin
Apple	Maçã/ Portugal (Alcobaça)	Malus domestica Borkh var. jonagold	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	3,5 (nw=2)	ND	ND	26 (nw=2)	ND
Apple	Maçã/ Portugal (Alcobaça)	Malus domestica Borkh var. reineta	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	10 (nw=2)	2,0 (nw=2)	ND	17 (nw=2)	4 (nw=2)
Apple	Maçã/ Portugal (Alcobaça)	Malus domestica Borkh var. royal gala	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	2,2 (nw=2)	3,0 (nw=2)	ND	11 (nw=2)	ND
Apple	Maçã/ Portugal (Alcobaça)	Malus domestica Borkh var. starking	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	9,7 (nw=2)	ND	ND	13 (nw=2)	ND
Apple	Maçã/Portugal (Cova da Beira)	Malus domestica Borkh var. starking	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	16 (nw=2)	1,8 (nw=2)	ND	48 (nw=2)	ND
Apple	Maçã/ Portugal (Mangualde)	Malus domestica Borkh var. starking	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	10 (nw=2)	2,2 (nw=2)	ND	36 (nw=2)	ND
Cherry	Cereja /Portugal (Cova da Beira)	Prunus avium L., var. de sacco	Fruit	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	130 \pm 2,73 (nw=2) (min-35 \pm 66,5(nw=2)	27 \pm 0,43 (nw=2) (min-66 \pm 60,06(nw=2)	29 \pm 6,96 (nw=2) (min-23;max-37)	82 \pm 4,59 (nw=2) (min-78;max-87)	21 \pm 2,73 (nw=2) (min-18;max-23)
Orange	Laranja/ Portugal (Algoz)	Citrus sinensis L., var. navel lane late	Fruit	orange	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	38 (nw=2)	100 (nw=2)	27 (nw=2)	18 (nw=2)	150 (nw=2)
Orange	Laranja/ Portugal (Faro)	Citrus sinensis L., var. navel lane late	Fruit	orange	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	34 (nw=2)	72 (nw=2)	11 (nw=2)	49 (nw=2)	210 (nw=2)
Orange	Laranja/ Portugal (Silves)	Citrus sinensis L., var. navel lane late	Fruit	orange	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	72 (nw=2)	190 (nw=2)	12 (nw=2)	43 (nw=2)	230 (nw=2)
Orange	Laranja/ Portugal (Tavira)	Citrus sinensis L., var. navel lane late	Fruit	orange	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	75 (nw=2)	26 (nw=2)	8,2 (nw=2)	170 (nw=2)	210 (nw=2)
Peach	Pessego /Portugal (Cova da Beira)	Prunus persica L., var. m carnival	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	6,87 \pm 2,81 (nw=2) (min-<LQ(0,0024)	<LQ(0,0024)	ND	<LQ(0,003)	2,15 \pm 1,16 (nw=2)
Pear	Pêra /Portugal (Alcobaça)	Pyrus communis L., var. rocha	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	ND	4400 (nw=2)	ND	ND	2500 (nw=2)	ND
Beetroot leaves	Beterraba / Portugal (Ribatejo)	Beta vulgaris L., var. vulgaris	vegetable	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSA/HPLC	ND	3600 (nw=2)	130 (nw=2)	ND	2900 (nw=2)	ND
Leaf Beet		Beta vulgaris L.,ssp. Vulgaris convar. Clita (L.) Alef.	vegetable	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSA/HPLC	ND	3600 (nw=2)	130 (nw=2)	ND	2900 (nw=2)	ND

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	Quality assessment	β -cryptoxanthin	lycopene	lutein	zeaxanthin	<i>all-E</i> - α -carotene	<i>all-E</i> - β -caroten
Galega Kale	Couve Galega / Portugal (Ribatejo)	Brassica oleracea L., var. acephala D.C. (June)	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	3700 (nw=2)	ND	ND	ND	2600 (nw=2)
Galega Kale	Couve Galega / Portugal (Ribatejo)	Brassica oleracea L., var. acephala D.C. (October)	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	5900 (nw=2)	ND	ND	ND	4200 (nw=2)
Galega Kale	Couve Galega / Portugal (Ribatejo)	Brassica oleracea L., var. acephala D.C. (December)	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	7200 (nw=2)	ND	ND	ND	6400 (nw=2)
Purslane	Beldroega / Portugal (Ribatejo)	Portulaca oleracea L. spp sativa (Haw.) Schübl & Mart.	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	5400 (nw=2)	190 (nw=2)	9 (nw=2)	9 (nw=2)	3500 (nw=2)
Tronchuda cabbage	Couve Tronchuda / Portugal (Beira Alta)	Brassica oleracea L. var. costata DC. Glória Portugal	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	520 (nw=2)	ND	ND	ND	460 (nw=2)
Tronchuda cabbage	Couve Tronchuda / Portugal (Minho)	Brassica oleracea L. var. costata DC. Penca	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	3300 (nw=2)	ND	ND	ND	2800 (nw=2)
Tronchuda cabbage	Couve Tronchuda / Portugal (Ribatejo)	Brassica oleracea L. var. costata DC. Valhascos	vegetable	unknown	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	4700 (nw=2)	ND	ND	ND	3600 (nw=2)
Turnip greens	Nabiças / Portugal (Ribatejo)	Brassica rapa L. var. rapa	vegetable	green	Raw	Without	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC		ND	5600 (nw=2)	ND	ND	ND	4400 (nw=2)
Tomato	Tomate / Portugal	Lycopersicon esculentum M. var.	Fruit	red	Raw	With	ripe		UNSAP/HPLC	linearity, repeatabilit	<6	8000 \pm 2000	100 \pm 17	<8	<8	1000 \pm 140
Tomato	Tomate / Portugal	Lycopersicon esculentum M. var.	Fruit	red	Raw	With	ripe		UNSAP/HPLC	linearity, repeatabilit	<6	2300 \pm 570	80 \pm 15	<8	<8	390 \pm 56

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	lycopene	<i>all-E</i> - α - carotene	<i>all-E</i> - β - carotene	<i>all-E</i> - β - cryptoxanthin	<i>all-E</i> - lycopene	<i>all-E</i> -lutein	<i>all-E</i> - zeaxanthin
Orange	Laranja / Netherlands	Citrus sinensis L. (Method 1)	Fruit	orange	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	61 \pm 10 (nw=3)	ND	ND	61 \pm 10 (nw=3)	640 \pm 190 (nw=3)	ND	78,3 \pm 8 (nw=3)	65 \pm 16 (nw=3)
Orange	Laranja / Netherlands	Citrus sinensis L. (Method 2)	Fruit	orange	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	33,5 \pm 6,5 (nw=3)	ND	ND	33,5 \pm 6,5 (nw=3)	544 \pm 98 (nw=3)	ND	27,9 \pm 1,5 (nw=3)	61,9 \pm 8,6 (nw=3)
Orange	Laranja / Netherlands	Citrus sinensis L. (Method 3)	Fruit	orange	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	43 \pm 15 (nw=3)	ND	ND	43 \pm 15 (nw=3)	663 \pm 81 (nw=3)	ND	56 \pm 13 (nw=3)	98 \pm 27 (nw=3)
Peach	Pêssego / Netherlands	Prunus persica L. (Method 1)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	102 \pm 22 (nw=3)	ND	ND	101 \pm 21 (nw=3)	33 \pm 13 (nw=3)	ND	132 \pm 21 (nw=3)	59 \pm 64 (nw=3)
Peach	Pêssego / Netherlands	Prunus persica L. (Method 2)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	106,3 \pm 3,4 (nw=3)	ND	ND	105,7 \pm 3,3 (nw=3)	38,6 \pm 1,9 (nw=3)	ND	95,7 \pm 5,4 (nw=3)	49,7 \pm 3,3 (nw=3)
Peach	Pêssego / Netherlands	Prunus persica L. (Method 3)	Fruit	unknown	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	130 \pm 36 (nw=3)	ND	ND	113 \pm 28 (nw=3)	74 \pm 11 (nw=3)	ND	171 \pm 54 (nw=3)	79 \pm 46 (nw=3)
Baby food	Netherlands	vegetables with egg, Olvarit; Nutricia (Method 1)		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	UNSA/HPLC	436 \pm 35 (nw=3)	1720 \pm 170 (nw=3)	176 \pm 45 (nw=3)	227 \pm 78 (nw=3)	62,4 \pm 7,8 (nw=3)	1170 \pm 100 (nw=3)	168 \pm 37 (nw=3)	68,8 \pm 1,2 (nw=3)
Baby food	Netherlands	vegetables with egg, Olvarit; Nutricia (Method 2)		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	SAP/HPLC	481 \pm 40 (nw=3)	1780 \pm 160 (nw=3)	144,6 \pm 9,1 (nw=3)	170 \pm 14 (nw=3)	ND	NS	107 \pm 15 (nw=3)	18,6 \pm 5,1 (nw=3)
Baby food	Netherlands	vegetables with egg, Olvarit; Nutricia (Method 3)		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	SAP/HPLC	493 \pm 54 (nw=3)	1930 \pm 130 (nw=3)	141 \pm 13 (nw=3)	236 \pm 31 (nw=3)	33,2 \pm 3,8 (nw=3)	1160 \pm 600 (nw=3)	190 \pm 69 (nw=3)	23 \pm 8,2 (nw=3)
NIST 2383		Method 1		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	UNSA/HPLC	259 \pm 79 (nw=3)	681 \pm 95 (nw=3)	76 \pm 20 (nw=3)	227 \pm 78 (nw=3)	107 \pm 35 (nw=3)	(nw=3)	165 \pm 17 (nw=3)	79 \pm 21 (nw=3)
NIST 2384		Method 2		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	SAP/HPLC	187 \pm 15 (nw=3)	NS	78,5 \pm 5 (nw=3)	170 \pm 14 (nw=3)	123 \pm 14 (nw=3)	NS	101,4 \pm 6 (nw=3)	80,8 \pm 8,3 (nw=3)
NIST 2385		Method 3		unknown	Unknown	Without	Not applicable	Other	SAP/HPLC	261 \pm 35 (nw=3)	499 \pm 86 (nw=3)	95,6 \pm 4 (nw=3)	236 \pm 31 (nw=3)	131 \pm 54 (nw=3)	(nw=3)	118 \pm 32 (nw=3)	90 \pm 40 (nw=3)

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name * [including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	lycopene	all-E- α - carotene	all-E- β - carotene	all-E- lycopene	all-E-lutein	all-E- zeaxanthin	cis- neoxanthin
Kale (Galega)	Couve Galega / Portugal	Brassica oleracea L., var. acephala	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	6820 ± 330 (nw=3)	ND	ND	6090 ± 320 (nw=3)	ND	11250 ± 730 (nw=3)	ND	
Kale (Galega)	Couve Galega / Portugal	Brassica oleracea L., var. acephala	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	2060 ± 350 (nw=3)	ND	ND	1730 ± 340 (nw=3)	ND	8410 ± 330 (nw=3)	ND	
Kale (Galega)	Couve Galega / Portugal	Brassica oleracea L., var. acephala	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	6890 ± 900 (nw=3)	ND	ND	5790 ± 900 (nw=3)	ND	10280 ± 830 (nw=3)	ND	
Leaf Beet	Netherlands	Beta vulgaris L., sp. Vulgaris convar.	vegetable	green	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	3490 ± 350 (nw=3)	ND	ND	3110 ± 330 (nw=3)	ND	5210 ± 650 (nw=3)	ND	
Leaf Beet	Netherlands	Beta vulgaris L., sp. Vulgaris convar.	vegetable	green	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	2910 ± 270 (nw=3)	ND	ND	2410 ± 230 (nw=3)	ND	3810 ± 330 (nw=3)	320 ± 120 (nw=3)	
Leaf Beet	Netherlands	Beta vulgaris L., sp. Vulgaris convar.	vegetable	green	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	3330 ± 590 (nw=3)	ND	ND	2790 ± 590 (nw=3)	ND	4460 ± 770 (nw=3)	250 ± 54 (nw=3)	
Pumpkin	Abobora / Portugal	Curcubita pepo L. var. styriaca Greb.	vegetable	unknown	Raw	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	186 ± 58 (nw=3)	ND	44 ± 12 (nw=3)	186 ± 58 (nw=3)	ND	76 ± 13 (nw=3)	ND	
Pumpkin	Abobora / Portugal	Curcubita pepo L. var. styriaca Greb.	vegetable	unknown	Raw	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	275 ± 44 (nw=3)	ND	65,17 ± 0,75 (nw=3)	269 ± 33 (nw=3)	ND	ND	ND	
Pumpkin	Abobora / Portugal	Curcubita pepo L. var. styriaca Greb.	vegetable	unknown	Raw	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	232,47 ± 0,64 (nw=3)	ND	56,4 ± 7,7 (nw=3)	232,47 ± 0,64 (nw=3)	ND	49 ± 15 (nw=3)	ND	
Tomato	Tomate / Portugal	Lycopersicon esculentum M.	Fruit	red	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	170 ± 100 (nw=3)	8440 ± 740 (nw=3)	ND	170 ± 100 (nw=3)	6700 ± 1000	102 ± 7,3 (nw=3)	ND	
Tomato	Tomate / Portugal	Lycopersicon esculentum M.	Fruit	red	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	607 ± 90 (nw=3)	8340 ± 870 (nw=3)	ND	513 ± 75 (nw=3)	NS	ND	ND	
Tomato	Tomate / Portugal	esculentum M. (Method 3)	Fruit	red	Raw/Frozen	With	Unknown	Conventional	UNSAP/HPLC	255 ± 29 (nw=3)	9600 ± 1100 (nw=3)	ND	255 ± 29 (nw=3)	9050 ± 900 (nw=3)	77,1 ± 6,3 (nw=3)	ND	
Camu Camu	Camu camu / Amazon (Brazil-	Myrciaria dubia	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	72,8 ± 74,6 (nl=3)					160,5 ± 114 (nl=3)		2,1 ± 1,8 (nl=3)
Camu Camu	Camu camu / Amazon (Brazil-	Myrciaria dubia	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	142,3 ± 23,7 (nl=3)					601,9 ± 92,5 (nl=3)		16,0 ± 10,2 (nl=3)
Guava	Goiaba /Brazil	Psidium guajal. var. Paluma	Fruit	red	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	366,3 ± 64 (nw=5)	6999,3 ± 2420,5 (nw=5)						

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	β -cryptoxanthin	lycopene	<i>all-E</i> β -carotene	<i>all-trans</i> -violaxanthi	<i>cis</i> -violaxanthi
Guava	Goiaba /Brazil	Psidiumguajal. var. Paluma	Fruit	red	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	432,4 \pm 81 (nw=5)		7649,9 \pm 1599,2 (nw=5)			
Guava	Goiaba /Brazil	Psidiumguajal. var. Paluma	Fruit	red	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	364,2 \pm 121,7 (nw=5)		7023,8 \pm 1739,3 (nw=5)			
Guava	Goiaba /Brazil	Psidiumguajal. var. Paluma	Fruit	red	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	351,3 \pm 84,6 (nw=5)		5503,4 \pm 1668,8 (nw=5)			
Mango	Manga / Brazil	Mangiferaindical. var. TommyAtkins	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	1557,1 \pm 180,2 (nw=5)		77,2 \pm 58,0 (nw=5)			
Mango	Manga / Brazil	Mangiferaindical. var. TommyAtkins	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	1748,2 \pm 249,4 (nw=5)		81,2 \pm 69,2 (nw=5)			
Mango	Manga / Brazil	Mangiferaindical. var. TommyAtkins	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	1747,5 \pm 178,9 (nw=5)		74,4 \pm 60,7 (nw=5)			
Mango	Manga / Brazil	Mangiferaindical. var. TommyAtkins	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	1490,1 \pm 284,4 (nw=5)		57,4 \pm 37,4 (nw=5)			
Papaya	Mamão / Brazil	Carica papaya L. var. Formosa (control)	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	548,6 \pm 175,1 (nw=5)	3798,6 \pm 278,0 (nw=5)	3137,5 \pm 596,3 (nw=5)			
Papaya	Mamão / Brazil	Carica papaya L. var. Formosa (after Carica papaya L. var. Formosa (during	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	468,1 \pm 224,3 (nw=5)	3477,0 \pm 1043,7 (nw=5)	3131,4 \pm 1485,8 (nw=5)			
Papaya	Mamão / Brazil	Carica papaya L. var. Formosa (during	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	598,0 \pm 103,4 (nw=5)	4097,3 \pm 596,9 (nw=5)	4281,0 \pm 635,6 (nw=5)			
Papaya	Mamão / Brazil	Carica papaya L. var. Formosa (final distr.)	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	SAP/HPLC	513,9 \pm 256,9 (nw=5)	3435,0 \pm 1723,2 (nw=5)	3105,4 \pm 1482,7 (nw=5)			
Passion fruit	cerrado / Brazil	Mast CPAC MJ-26-01	Fruit	cream	Raw	With	Unknown	cultivated /					30 \pm 10 / 60 \pm 0		
Passion fruit	suspiro / Brazil	MJ-01-03	Fruit	unknown	Raw	With	Unknown	cultivated /					5 \pm 0		
Passion fruit	sono / Brazil	MJ-12-01-BRS Pérola	Fruit	light yellow	Raw	With	Unknown	cultivated /					66 \pm 9		18 \pm 6
Passion fruit	amarelo / Brazil	MJ-36-01	Fruit	deep yellow	Raw	With	Unknown	cultivated /			24 \pm 2		284 \pm 0,6	50 \pm 5	
Passion fruit	Brazil	MJ-21-01	Fruit	deep yellow	Raw	With	Unknown	cultivated /			20 \pm 3		260 \pm 10		
Passion fruit	Maracujá / Brazil	P. edulis Sims.	Fruit	unknown	Raw	With	Unknown	Domesticated /			175 \pm 8		360 \pm 10	60 \pm 8	120 \pm 16
Passion fruit	Maracujá / Brazil	P. edulis Sims.	Fruit	unknown	Raw	With	Unknown	Domesticated /			180 \pm 20		780 \pm 80	50 \pm 10	121 \pm 20

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	β -cryptoxanthin	lycopene	VIOLAXANTHIN	all-E- β -carotene	all-E- β -cryptoxanthin	all-E-lycopene	all-E-lutein	all-trans-violaxanthin	all-E-capsanthin
Pepper	Pimentão / Brazil	Capsicum annuum L. (F1 Magali hybrid)	vegetable	yellow	Raw	Without	ripe	Conventional	SAP/HPLC					230 ± 80 (nl=5; nw=2)			120 (nl=5; nw=2)	(nl=5; nw=2)	
Pepper	Pimentão / Brazil	Capsicum annuum L. (F1 Amanda hybrid)	vegetable	red	Raw	Without	ripe	Conventional	SAP/HPLC					580 ± 60 (nl=5; nw=2)			750 ± 80 (nl=5; nw=2)	270 ± 50 (nl=5; nw=2)	3260 ± 270 (nl=5; nw=2)
Papaya	Mamão/ Brazil	Carica papaya (Formosa)	Fruit	reddish-orange	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	700 ± 170 (nl=5; nw=2)	2300 ± 750 (nl=5; nw=2)			120 ± 50 (nl=5; nw=2)	670 ± 170 (nl=5; nw=2)	1970 ± 630 (nl=5; nw=2)			
Papaya	Mamão/ Brazil	Carica papaya (Sunrise)	Fruit	reddish-orange	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	820 ± 120 (nl=5; nw=2)	2390 ± 920 (nl=5; nw=2)			50 ± 160 (nl=5; nw=2)	760 ± 120 (nl=5; nw=2)	2070 ± 790 (nl=5; nw=2)			
Papaya	Mamão/ Brazil	Carica papaya (Golden)	Fruit	orange	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	870 ± 90 (nl=5; nw=2)	1850 ± 640 (nl=5; nw=2)			120 ± 30 (nl=5; nw=2)	810 ± 90 (nl=5; nw=2)	1630 ± 450 (nl=5; nw=2)			
Peach	Pêssego / Brazil	Prunus pérsica (Diamante)	Fruit	orange	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	640 ± 110 (nl=5; nw=2)			12 2 (nl=5; nw=2)	40 ± 6 (nl=5; nw=2)	590 ± 110 (nl=5; nw=2)			9 ± 1 (nl=5; nw=2)	
Peach	Pêssego / Brazil	Prunus pérsica (Coral)	Fruit	white	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	8 ± 0 (nl=5; nw=2)				3 ± 4 (nl=5; nw=2)	8 ± 0 (nl=5; nw=2)				
Peach	Pêssego / Brazil	Prunus pérsica (Xiripá)	Fruit	white	Raw	With	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	7 ± 1 (nl=5; nw=2)				6 ± 1 (nl=5; nw=2)	6 ± 2 (nl=5; nw=2)				
Guava	Goiaba / Brazil	Psidium guajal. var. Paluma	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	366,3 ± 64 (nw=5)		6999,3 ± 2420,5 (nw=5)							
Papaya	Mamão/ Brazil	Carica papaya L. var. Formosa	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	175,1 (nw=5)	3798,6 ± 278 (nw=5)	596,3 (nw=5)							
Mango	Manga / Brazil	Mangifera indica L. var. Tommy Atkins	Fruit	unknown	Raw	With	ripe	Conventional	UNSAP/HPLC	1557,1 ± 180,2 (nw=5)		77,2 ± 58,4 (nw=5)							
Hill cherry	Panama	Bunchosia nitida	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC										

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	lutein	zeaxanthin
Hill cherry	Panama	Bunchosia nitida	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	750 ± 60 (nw=4)	ND
Membrillo	Panama	Gustavia superba	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	670 ± 50 (nw=4)	3760 ± 400 (nw=4)
Black Palm	Panama	Astrocaryum standleyi	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	440 ± 30 (nw=4)	ND
Canistel	Panama	Pouteria campachiana	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	ND	1970 ± 160 (nw=4)
Chinese passion fruit	Panama	Cionosicyos macranth	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	ND	280 ± 20 (nw=4)
Sastra	Panama	Garcinia intermedia	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	3680 ± 290 (nw=4)	8470 ± 750 (nw=4)
yellow mombin	Panama	Spondias mombin	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	860 ± 70 (nw=4)	120 ± 20 (nw=4)
Guanabana toreta	Panama	Annona purpurea	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	230 ± 20 (nw=4)	680 ± 90 (nw=4)
Purple mombin	Panama	Spondias purpurea	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	630 ± 50 (nw=4)	80 ± 10 (nw=4)
Chinese rose	Panama	Pereskia bleo	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	830 ± 100 (nw=4)	80 ± 10 (nw=4)
Nance	Panama	Birsominia crassiflora	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Wild or gathered	SAP/HPLC	70 ± 10 (nw=4)	20 ± 10 (nw=4)
Red mamey	Panama	Pouteria sapota	Fruit	red	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	ND	ND
Corozo	Panama	Aiphanes aculeata	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	7920	1030 (nw=4)
South American sap	Panama	Quararibea cordata	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	220 ± 20 (nw=4)	4620 620 (nw=4)
Red guava	Panama	Psidium guajava	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	120 ± 20 (nw=4)	ND

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	lutein	zeaxanthin
Orange mamey	Panama	Pouteria sapota	Fruit	orange	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	ND	ND
Watermelon	Panama	Citrullus vulgaris	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	ND	ND
Passion fruit	Panama	Pasiflora edulis	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	10 ± 10 (nw=	20 ± 10 (nw=4)
Tree tomato	Panama	Cyphomandra betacea	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	190 ± 10 (nw=	170 ± 20 (nw=4)
Mango	Panama	Mangifera indica	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	60 ± 10 (nw=	50 ± 10 (nw=4)
Mandarin	Panama	Citrus reticulata	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	200 ± 30 (nw=	210 ± 20 (nw=4)
Melo	Panama	Cucumis melo	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	30 ± 10 (nw=	10 ± 10 (nw=4)
Cassablanca	Panama	Sicana odorifera	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	10 ± 10 (nw=	40 ± 10 (nw=4)
Red tree tomato	Panama	Cyphomandra betacea	Fruit	red	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	170 ± 20 (nw=	240 ± 20 (nw=4)
Red papaya	Panama	Carica papaya	Fruit	red	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	20 ± 10 (nw=	60 ± 10 (nw=4)
Grafted orange	Panama	Citrus sinensis	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	70 ± 20 (nw=	110 ± 20 (nw=4)
Mandarin juice	Panama	Citrus reticulata	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	160 ± 20 (nw=	170 ± 30 (nw=4)
Yellow papaya	Panama	Carica papaya	Fruit	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	10 ± 10 (nw=	ND
Pineapple	Panama	Ananas comosus	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	10 ± 10 (nw=	10 ± 10 (nw=4)
Cashew	Panama	Anacardium occidentale	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	40 ± 10 (nw=	10 ± 10 (nw=4)
Aguacate	Panama	Persea americana	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated / Domesticated /	SAP/HPLC	320 ± 40 (nw=	ND

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	lutein	zeaxanthin
Grafted orange (juice)	Panama	Citrus sinensis	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	50 ± 10 (nw=4)	60 ± 10 (nw=4)
Red grapefruit	Panama	Citrus grandis	Fruit	red	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	20 ± 10 (nw=4)	20 ± 10 (nw=4)
Red cashew	Panama	Anacardium occidentale	Fruit	red	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	20 ± 10 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Naranjilla	Panama	Solanum quitoense	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	190 ± 30 (nw=4)	ND
Orange	Panama	Citrus sinensis	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	30 ± 10 (nw=4)	30 ± 10 (nw=4)
Tahitian apple	Panama	Spondias dulces	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	50 ± 20 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Cocona	Panama	Solanum sessiliflorum	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	40 ± 20 (nw=4)	ND
yellow guava	Panama	Psidium guajava	Fruit	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	40 ± 10 (nw=4)	20 ± 10 (nw=4)
Roselle	Panama	Hibiscus sabdariffa	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	ND	80 ± 30 (nw=4)
Orange juice	Panama	Citrus sinensis	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	10 ± 10 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Plantain	Panama	Musa paradisiaca	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	40 ± 20 (nw=4)	ND
India mustard	Panama	Brassica juncea	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	5380 ± 420 (nw=4)	80 ± 10 (nw=4)
Beet	Panama	Beta vulgaris	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	5310 ± 610 (nw=4)	70 ± 10 (nw=4)
Espinach	Panama	Spinacea juncea	vegetable	green	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	4370 ± 380 (nw=4)	70 ± 10 (nw=4)
Watercress	Panama	Nasturium officinale	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	4280 ± 380 (nw=4)	40 ± 10 (nw=4)
Endive	Panama	Cichorium endivia	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	3420 ± 400 (nw=4)	50 ± 10 (nw=4)
Romaine lettuce	Panama	Lactuca sativa (longifolia)	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	2110 ± 140 (nw=4)	70 ± 10 (nw=4)
Lettuce	Panama	Lactuca sativa	vegetable	green	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	200 ± 10 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Cabbage	Panama	Brassica oleracea (var capitata)	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	250 ± 10 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Squash	Panama	Cucurbita maxima	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	8170 ± 1510 (nw=4)	190 ± 30 (nw=4)

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if possible,	Fruit/ vegetable	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	lutein	zeaxanthin
Red pepper	Panama	Capsium annumm	vegetable	red	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	220 ± 40 (nw=4)	440 ± 40 (nw=4)
orange pepper	Panama	Capsium annumm	vegetable	orange	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	790 ± 60 (nw=4)	6200 ± 880 (nw=4)
Carrot	Panama	Daucus carota	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	360 ± 50 (nw=4)	ND
Tomato	Panama	Solanum lycopersicum	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	340 ± 60 (nw=4)	130 ± 20 (nw=4)
Yellow pepper	Panama	Capsium anuumm	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	220 ± 20 (nw=4)	440 ± 60 (nw=4)
Broccoli	Panama	(italica)	vegetable	green	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	140 ± 20 (nw=4)	ND
Kidney been	Panama	Phaseolus vulgaris	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	430 ± 50 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Green pepper	Panama	Capsium anuumm	vegetable	green	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	390 ± 40 (nw=4)	ND
Okra	Panama	esculentus	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	520 ± 30 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Red peach palm	Panama	Bactris gasipaes	vegetable	red	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	120 ± 20 (nw=4)	ND
Orange peach palm	Panama	Bactris gasipaes	vegetable	orange	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	90 ± 20 (nw=4)	ND
Sweetpotato	Panama	Ipomoea batatas	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	90 ± 10 (nw=4)	30 ± 10 (nw=4)
Corn flour	Panama	Zea mays	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	210 ± 20 (nw=4)	940 ± 70 (nw=4)
Yellow peach palm	Panama	Bactris gasipaes	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	310 ± 60 (nw=4)	ND
GreenFrench plantain	Panama	Musa paradisiaca (AAB)	vegetable	green	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	40 ± 10 (nw=4)	ND
Ripe French plantain	Panama	Musa paradisiaca (AAB)	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	150 ± 20 (nw=4)	ND
Boiled corn	Panama	Zea mays	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	280 ± 40 (nw=4)	370 ± 50 (nw=4)
Potato	Panama	Solanum tuberosum	vegetable	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	70 ± 10 (nw=4)	770 ± 60 (nw=4)
Yellow potato	Panama	Solanum tuberosum	vegetable	yellow	Raw	Unknown	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	70 ± 10 (nw=4)	50 ± 10 (nw=4)
Apricot	(Panama/ imported)	Prunus armeniaca	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	60 ± 10 (nw=4)	30 ± 10 (nw=4)
groundcherry	(Panama/ imported)	Physalis peruviana	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	250 ± 20 (nw=4)	40 ± 10 (nw=4)
Nectarin	(Panama/ imported)	Prunus persica	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	30 ± 10 (nw=4)	20 ± 10 (nw=4)
European plum	(Panama/ imported)	Prunus domestica	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	90 ± 20 (nw=4)	10 ± 10 (nw=4)
Kiwi	(Panama/ imported)	Actinidia deliciosa	Fruit	unknown	Raw	Unknown	Unknown	Unknown	SAP/HPLC	70 ± 10 (nw=4)	ND

Name (english)	Name (native)	Scientific name *(including, if	Fruit/vegetable	Colour (of edible)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	β -carotene	β -cryptoxanthin	lutein	zeaxanthin	NEOXANTHIN	VIOLAXANTHIN	CAPSANTHIN	CAPSORUBIN	LACTUCAXANTHIN
Red pepper (pericarp)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-1)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSA/HPLC	22300 (nw=4)	17400 (nw=4)		35100 (nw=4)			136900 (nw=4)	71700 (nw=4)	
Red pepper (pericarp)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-2)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSA/HPLC	19700 (nw=4)	14900 (nw=4)		34200 (nw=4)			128100 (nw=4)	57000 (nw=4)	
Red pepper (pericarp)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-3)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSA/HPLC	31400 (nw=4)	23300 (nw=4)		58500 (nw=4)			183700 (nw=4)	106500 (nw=4)	
Red pepper (pericarp)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-4)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSA/HPLC	41800 (nw=4)	33000 (nw=4)		68400 (nw=4)			184200 (nw=4)	83200 (nw=4)	
Red pepper (pericarp)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-5)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	UNSA/HPLC	21700 (nw=4)	20600 (nw=4)		40000 (nw=4)			159600 (nw=4)	102200 (nw=4)	
Red pepper (paprika)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-1)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	13700 (nw=4)	8400 (nw=4)		25300 (nw=4)			62200 (nw=4)	19700 (nw=4)	
Red pepper (paprika)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-2)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	12200 (nw=4)	9700 (nw=4)		24800 (nw=4)			81800 (nw=4)	30000 (nw=4)	
Red pepper (paprika)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-3)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	14500 (nw=4)	11900 (nw=4)		31000 (nw=4)			93400 (nw=4)	45200 (nw=4)	
Red pepper (paprika)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-4)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	20900 (nw=4)	17700 (nw=4)		39900 (nw=4)			101800 (nw=4)	41600 (nw=4)	
Red pepper (paprika)	Spain	Capsicum annuum L. (RR-5)	vegetable	red	Dried	Without	Unknown	Domesticated / cultivated /	SAP/HPLC	18100 (nw=4)	13900 (nw=4)		35500 (nw=4)			110100 (nw=4)	55400 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine-	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSA/HPLC	2640 \pm 300 (nw=4)		1170 \pm 90 (nw=4)		340 \pm 30 (nw=4)	590 \pm 30 (nw=4)			680 \pm 30 (nw=4)
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine- Espuña)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSA/HPLC	2460 \pm 500 (nw=4)		1000 \pm 210 (nw=4)		320 \pm 60 (nw=4)	550 \pm 100 (nw=4)			590 \pm 110 (nw=4)
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine- Aitana)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSA/HPLC	3490 \pm 230 (nw=4)		1390 \pm 120 (nw=4)		460 \pm 40 (nw=4)	750 \pm 50 (nw=4)			820 \pm 70 (nw=4)
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine- Collado)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSA/HPLC	3200 \pm 90 (nw=4)		1160 \pm 20 (nw=4)		350 \pm 10 (nw=4)	530 \pm 30 (nw=4)			810 \pm 70 (nw=4)
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine-	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSA/HPLC	3390 \pm 280 (nw=4)		1340 \pm 100 (nw=4)		410 \pm 30 (nw=4)	620 \pm 40 (nw=4)			860 \pm 80 (nw=4)

Name (english)	Name (native)	Scientific name *(including, if)	Fruit/vegetable	Colour (of edible)	Processing	peel /skin /bones	Ripeness	Production	Method	α-carotene	β-carotene	β-cryptoxanthin	lutein	NEOXANTHIN	VIOLAXANTHIN	LACTUCAXANTHIN	5-cis-Lycopene
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine- Isasa)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2010 ± 130 (nw=4)		770 ± 50 (nw=4)	230 ± 30 (nw=4)	500 ± 120 (nw=4)	400 ± 60 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Romaine- AR-	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		3300 ± 220 (nw=4)		1410 ± 110 (nw=4)	450 ± 60 (nw=4)	690 ± 70 (nw=4)	930 ± 80 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Ricote)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2050 ± 100 (nw=4)		780 ± 30 (nw=4)	260 ± 20 (nw=4)	450 ± 30 (nw=4)	500 ± 70 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Petra)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		1950 ± 100 (nw=4)		780 ± 70 (nw=4)	250 ± 20 (nw=4)	460 ± 10 (nw=4)	470 ± 20 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Etna)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		1880 ± 220 (nw=4)		840 ± 70 (nw=4)	260 ± 20 (nw=4)	430 ± 30 (nw=4)	580 ± 60 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Urbión)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2060 ± 50 (nw=4)		840 ± 40 (nw=4)	270 ± 10 (nw=4)	480 ± 30 (nw=4)	530 ± 50 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Sandra)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2070 ± 410 (nw=4)		870 ± 130 (nw=4)	270 ± 40 (nw=4)	490 ± 60 (nw=4)	480 ± 70 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Maite)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2270 ± 290 (nw=4)		970 ± 130 (nw=4)	310 ± 30 (nw=4)	530 ± 70 (nw=4)	650 ± 50 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Little Gem - Ferro)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		2030 ± 340 (nw=4)		780 ± 110 (nw=4)	250 ± 40 (nw=4)	420 ± 50 (nw=4)	460 ± 60 (nw=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Mini Romaine - Marta)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		4180 ± 590 (nw=4)		1490 ± 200 (nw=4)	500 ± 70 (nw=4)	750 ± 60 (nw=4)	1110 ± 70 (n=4)	
Lettuce	Spain	Lactuca sativa L. (Mini Romaine - AR-29232)	vegetable	green	Raw	Without	Unknown	Indoor/under glass	UNSAF/HPLC		3330 ± 140 (nw=4)		1270 ± 40 (n=4)	390 ± 10 (nw=4)	620 ± 30 (nw=4)	840 ± 30 (nw=4)	
Orange juice	Spain (Huelva)		Fruit	orange	ultrafozen	Without	Unknown	Conventional	SAP/HPLC	11 ± 5 (nl=17)	21 ± 7 (nl=17)	69 ± 27 (nl=17)					
Sofrito	Spain	(Sofrito A)		unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSAF/HPLC								205 ± 4 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito B)		unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSAF/HPLC								220 ± 5 (nw=4)

Name (english)	Name (native language) /	Scientific name *(including, if	Colour (of edible portion)	Processing	peel /skin / bones	Ripeness	Production	Method	5-cis-Lycopene	9-cis-Lycopene	13-cis-Lycopene	<i>all-E-α-carotene</i>	<i>all-E-β-carotene</i>	<i>all-E-lycopene</i>	<i>all-E-lutein</i>
Sofrito	Spain	(Sofrito A)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	205 ± 4 (nw=4)	144 ± 3 (nw=4)	199 ± 10 (nw=4)	83 ± 2 (nw=4)	1812 ± 13 (nw=4)	3340 ± 12 (nw=4)	296 ± 2 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito B)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	220 ± 5 (nw=4)	122 ± 2 (nw=4)	176 ± 11 (nw=4)	101 ± 1 (nw=4)	2540 ± 15 (nw=4)	3560 ± 16 (nw=4)	285 ± 3 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito C)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	244 ± 8 (nw=4)	139 ± 5 (nw=4)	183 ± 9 (nw=4)	79 ± 2 (nw=4)	2120 ± 11 (nw=4)	3180 ± 11 (nw=4)	301 ± 2 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito D)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	301 ± 9 (nw=4)	99 ± 1 (nw=4)	201 ± 8 (nw=4)	85 ± 1 (nw=4)	1940 ± 12 (nw=4)	3040 ± 18 (nw=4)	310 ± 5 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito E)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	281 ± 7 (nw=4)	188 ± 8 (nw=4)	209 ± 7 (nw=4)	110 ± 3 (nw=4)	2969 ± 11 (nw=4)	4050 ± 33 (nw=4)	342 ± 4 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito F)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	308 ± 8 (nw=4)	181 ± 8 (nw=4)	172 ± 4 (nw=4)	81 ± 2 (nw=4)	2120 ± 13 (nw=4)	3020 ± 16 (nw=4)	291 ± 4 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito G)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	250 ± 4 (nw=4)	121 ± 2 (nw=4)	176 ± 4 (nw=4)	73 ± 1 (nw=4)	1560 ± 11 (nw=4)	2932 ± 13 (nw=4)	255 ± 3 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito H)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	220 ± 3 (nw=4)	133 ± 4 (nw=4)	182 ± 5 (nw=4)	69 ± 2 (nw=4)	1330 ± 12 (nw=4)	3135 ± 18 (nw=4)	241 ± 5 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito I)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	299 ± 1 (nw=4)	141 ± 9 (nw=4)	183 ± 6 (nw=4)	68 ± 2 (nw=4)	1780 ± 19 (nw=4)	3013 ± 28 (nw=4)	258 ± 3 (nw=4)
Sofrito	Spain	(Sofrito J)	unknown	Other	Without	Unknown	Other	UNSA/HPLC	301 ± 9 (nw=4)	139 ± 5 (nw=4)	193 ± 5 (nw=4)	71 ± 1 (nw=4)	1650 ± 21 (nw=4)	2986 ± 14 (nw=4)	251 ± 2 (nw=4)


Anexo 5

Folha de cálculo para a determinação do teor de carotenoides

Amostra		NIST 2383				Nº amostra				331460				Nº/data requis.			
Executante		MAS				Pasta				Observações							
data análise	29/05/2014																
	trans- α -caroteno		trans- β -caroteno		cis- α -caroteno		cis- β -caroteno		trans-licopeno		cis-licopeno						
Replicado	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Saponificação	não		sim		não		sim		não		não		não		não		
Recta Calibração Y(Area) vs X(μ g/mL)	Declive		543000		543000		4,68*10 ⁵						470000				
	Ordenada Origem		-15200		-15200		1,22*10 ⁴						5770				
	r ²		0,999836		0,999836		0,999706						0,99711				
	Resíduos < 10% (níveis 2 a 6)																
S _v																	
Toma (g)	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	
Volume reconstituição (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Diluição	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Teor solução (μ g/mL)	0,2213	0,2074	0,1951	0,1812	0,5151	0,4915	0,4647	0,4308	0,0524	0,0532	0,0965	0,0904	1,5861	1,4085			
Teor replicado (mg/100 g)	0,043	0,041	0,0380	0,0356	0,1004	0,0967	0,0906	0,0847	0,0102	0,0105	0,0188	0,0178	0,3092	0,2771	0,0000	0,0000	
Desvio padrão relativo da repetibilidade (%)	2,0		2,3		1,4		2,4		0,9		2,0		3,9		#DIV/0!		
Teor médio amostra (mg/100 g)	0,0420		0,0368		0,0986		0,0877		0,0103		0,0183		0,2931		0,0000		
Recuperação (%)	77,82	65,70	68,29	57,69	77,82	65,70	68,29	57,69	77,82	65,70	77,82	65,70	77,82	65,70	77,82	65,70	
Teor replicado após recup. (mg/100 g)	0,0554	0,0621	0,0557	0,0618	0,1290	0,1472	0,1327	0,1469	0,0131	0,0159	0,0242	0,0271	0,3973	0,4217	0,0000	0,0000	
Desv. padrão rel. repetibilidade após recuperação (%)	4,0		3,7		4,7		3,6		6,9		4,0		2,1		#DIV/0!		
Teor médio amostra após recuperação (mg/100 g)	0,0588		0,0587		0,1381		0,1398		0,0145		0,0256		0,4095		0,0000		
Provitamina A em equivalentes retinol (μ g/100 g)	4,90				23,02				0,0000		4,2701		0,00				
Teor amostra (mg/100 g)	0,0588				0,1381				0,0145		0,0256		0,4095				
Teor amostra - resultado final (mg/100 g)																	
Resultado final (rúbrica e data)																	
Confirmação (rúbrica e data)								Validação (rúbrica e data)									

Anexo 6

Exemplo de um relatório de construção de uma reta de calibração no programa EMPOWER® para cada carotenoide



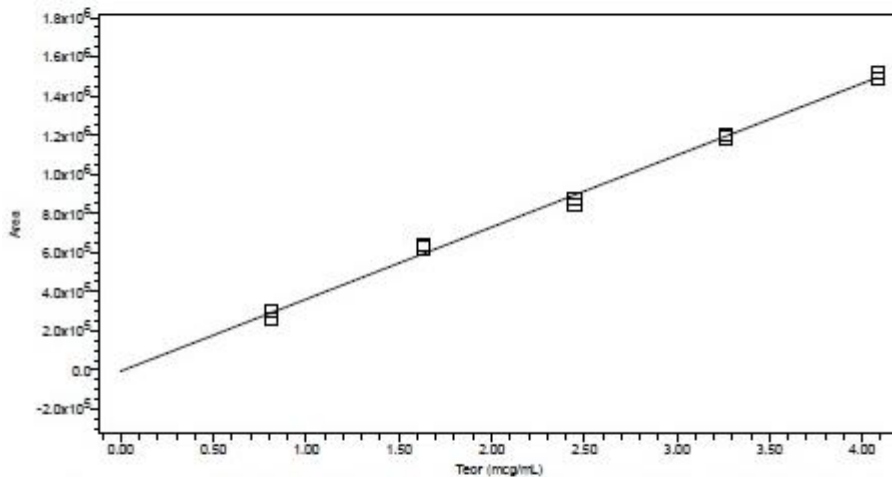
Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdías) Project Name: ReferencialCarotenoides_2014

Processing Method: 140507_CAR_MAS_1	Project Name: ReferencialCarotenoides_2014
Processing Method ID: 3114	System: HPLC3
Calibration ID: 4670	Channel: 2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated: 5/23/2014 11:24:20 AM	Proc. Chnl. Descr.: 2998 Ch1 450nm@1.2nm

Curva Calibração group for licopeno contains no data.

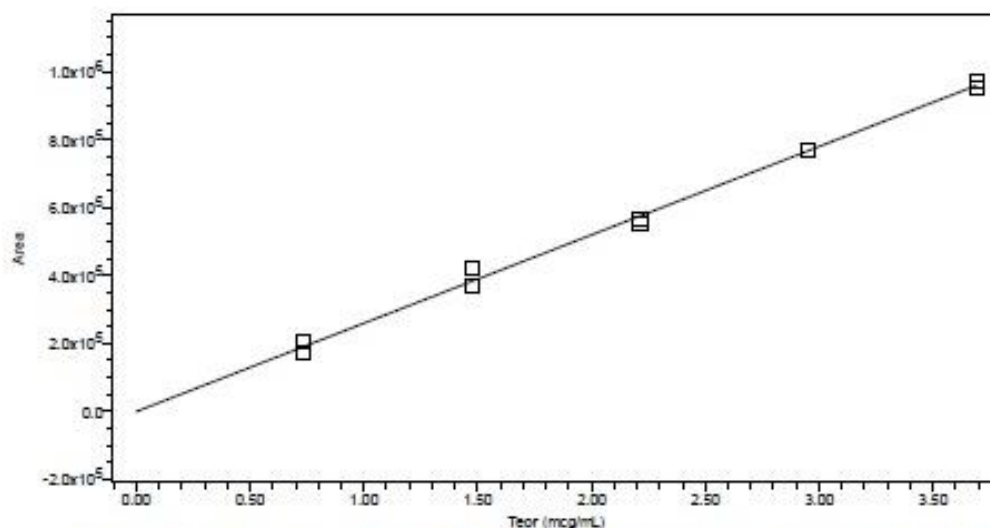
Point Information ' Peak: licopeno' table contains no data.



Name: a-caroteno; A -6549.78; B 367636.29; Standard Error 32211.45; R: 0.997703; R²: 0.995410; Equation: Y = 3.68e+005 X - 6.55e+003; RT: 21.915; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4675; Weighting: None

Peak: a-caroteno

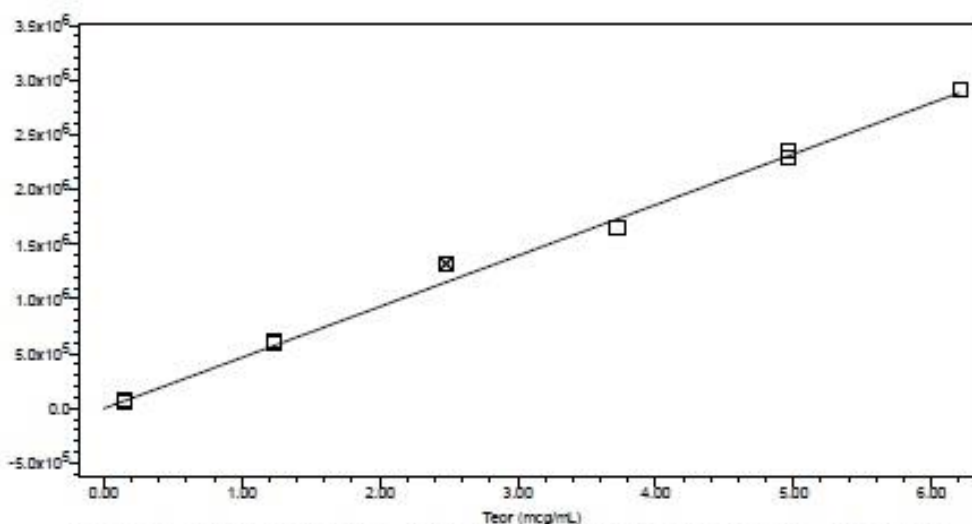
	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P2 C 2204	4696	a-caroteno		0.816	304548.640	0.846	-3.56	No	No
2	P2 C 2204	4700	a-caroteno		0.816	263322.352	0.734	11.17	No	No
3	P3 C 2204	4699	a-caroteno		1.632	638183.298	1.754	-6.94	No	No
4	P3 C 2204	4694	a-caroteno		1.632	622950.113	1.712	-4.68	No	No
5	P4 C 2204	4709	a-caroteno		2.448	874062.366	2.395	2.21	No	No
6	P4 C 2204	4711	a-caroteno		2.448	838344.371	2.298	6.53	No	No
7	P5 C 2204	4690	a-caroteno		3.264	1186370.027	3.245	0.60	No	No
8	P5 C 2204	4712	a-caroteno		3.264	1203612.114	3.292	-0.83	No	No
9	P6 C 2204	4693	a-caroteno		4.080	1520412.279	4.153	-1.76	No	No
10	P6 C 2204	4692	a-caroteno		4.080	1483241.727	4.052	0.69	No	No



Name: b-caroteno; A -536.51; B 260198.88; Standard Error 19001.25; R: 0.998047; R²: 0.996097; Equation: Y = 2.60e+005 X - 6.37e+002; RT: 24.997; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4676; Weighting: None

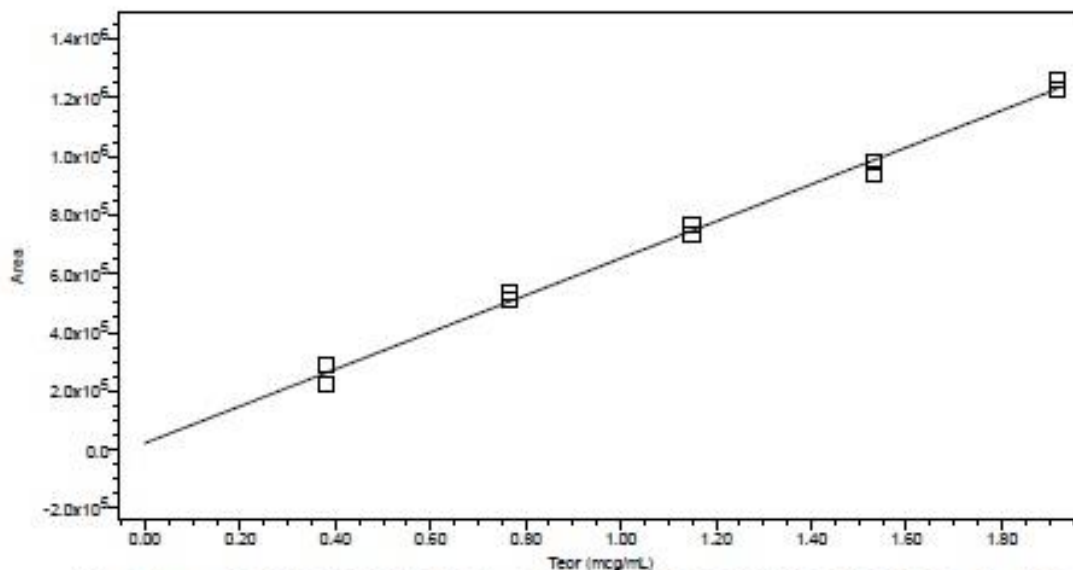
Peak: b-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P2 C 2204	4696	b-caroteno		0.738	174268.842	0.672	9.77	No	No
2	P2 C 2204	4700	b-caroteno		0.738	205303.006	0.791	-6.77	No	No
3	P3 C 2204	4699	b-caroteno		1.476	420833.871	1.620	-8.90	No	No
4	P3 C 2204	4694	b-caroteno		1.476	369496.510	1.423	3.74	No	No
5	P4 C 2204	4709	b-caroteno		2.214	567972.341	2.185	1.30	No	No
6	P4 C 2204	4711	b-caroteno		2.214	551936.598	2.124	4.24	No	No
7	P5 C 2204	4690	b-caroteno		2.952	771619.197	2.968	-0.55	No	No
8	P5 C 2204	4712	b-caroteno		2.952	766271.736	2.947	0.14	No	No
9	P6 C 2204	4693	b-caroteno		3.689	971760.941	3.737	-1.28	No	No
10	P6 C 2204	4692	b-caroteno		3.689	953986.333	3.669	0.56	No	No



Name: b-criptoxantina; A -2275.90; B 465135.92; Standard Error 47742.22; R: 0.999175; R²: 0.998351;
 Equation: $Y = 4.65e+005 X - 2.28e+003$; RT: 10.345; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4673;
 Weighting: None

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1 C 2204	4681	b-criptoxantina		0.152	57987.081	0.130	17.09	No	No
2	P1 C 2204	4706	b-criptoxantina		0.152	81140.100	0.179	-15.41	No	No
3	P2 C 2204	4700	b-criptoxantina		1.241	622790.779	1.344	-7.67	No	No
4	P2 C 2204	4696	b-criptoxantina		1.241	590473.916	1.274	-2.63	No	No
5	P3 C 2204	4694	b-criptoxantina		2.482	1319212.049			No	Yes
6	P3 C 2204	4699	b-criptoxantina		2.482	1322216.023			No	Yes
7	P4 C 2204	4709	b-criptoxantina		3.722	1652341.819	3.557	4.64	No	No
8	P4 C 2204	4711	b-criptoxantina		3.722	1659113.306	3.572	4.21	No	No
9	P5 C 2204	4690	b-criptoxantina		4.963	2357270.120	5.073	-2.16	No	No
10	P5 C 2204	4712	b-criptoxantina		4.963	2282091.508	4.911	1.06	No	No
11	P6 C 2204	4692	b-criptoxantina		6.204	2910395.738	6.262	-0.93	No	No
12	P6 C 2204	4693	b-criptoxantina		6.204	2910136.633	6.261	-0.92	No	No



Name: lycopeno; A 22620.30; B 629800.96; Standard Error 30919.75; R: 0.996729; R²: 0.993469; Equation: Y = 6.30e+005 X + 2.26e+004; RT: 17.359; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4748; Weighting: None

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P2 C 2204	4743	licopeno		0.383	288003.650	0.421	-9.11	No	No
2	P2 C 2204	4769	licopeno		0.383	223379.908	0.319	20.15	No	No
3	P3 C 2204	4764	licopeno		0.766	509290.720	0.773	-0.88	No	No
4	P3 C 2204	4755	licopeno		0.766	534831.462	0.813	-5.83	No	No
5	P4 C 2204	4757	licopeno		1.149	769634.261	1.186	-3.14	No	No
6	P4 C 2204	4756	licopeno		1.149	734123.008	1.130	1.70	No	No
7	P5 C 2204	4765	licopeno		1.532	977542.142	1.516	1.03	No	No
8	P5 C 2204	4758	licopeno		1.532	937231.497	1.452	5.49	No	No
9	P6 C 2204	4761	licopeno		1.915	1263113.148	1.970	-2.79	No	No
10	P6 C 2204	4767	licopeno		1.915	1224836.683	1.909	0.31	No	No



Curva Calibração

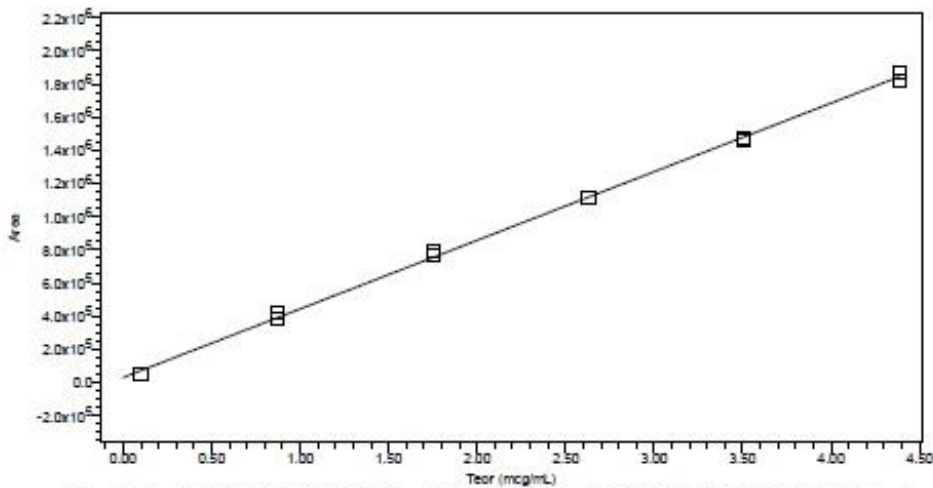
Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referência/Carotenoides_2014

Processing Method:	140507_CAR_MAS_1	Project Name:	Referência/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	3114	System:	HPLC3
Calibration ID:	4670	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	5/23/2014 11:24:20 AM	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Curva Calibração group for cis-licopeno contains no data.

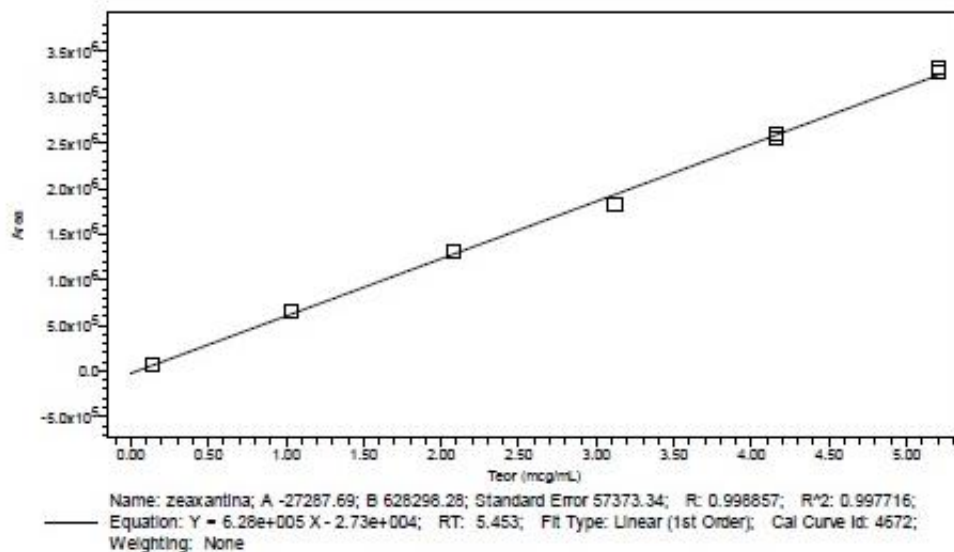
Point Information ' Peak: cis-licopeno' table contains no data.



Name: luteína; A 29594.33; B 413620.93; Standard Error 21301.16; R: 0.999491; R²: 0.998982; Equation: Y = 4.14e+005 X + 2.96e+004; RT: 5.133; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4671; Weighting: None

Peak: luteína

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1 C 2204	4681	luteína		0.100	49881.682	0.049	104.70	No	No
2	P1 C 2204	4706	luteína		0.100	52947.126	0.056	77.63	No	No
3	P2 C 2204	4700	luteína		0.877	416330.918	0.935	-6.25	No	No
4	P2 C 2204	4696	luteína		0.877	385376.568	0.860	1.91	No	No
5	P3 C 2204	4694	luteína		1.753	794344.472	1.649	-5.16	No	No
6	P3 C 2204	4699	luteína		1.753	767719.786	1.785	-1.76	No	No
7	P4 C 2204	4709	luteína		2.630	1116332.042	2.627	0.09	No	No
8	P4 C 2204	4711	luteína		2.630	1113611.769	2.621	0.34	No	No
9	P5 C 2204	4690	luteína		3.506	1475223.772	3.495	0.32	No	No
10	P5 C 2204	4712	luteína		3.506	1459272.509	3.456	1.44	No	No
11	P6 C 2204	4692	luteína		4.383	1820586.402	4.330	1.22	No	No
12	P6 C 2204	4693	luteína		4.383	1863715.121	4.434	-1.16	No	No

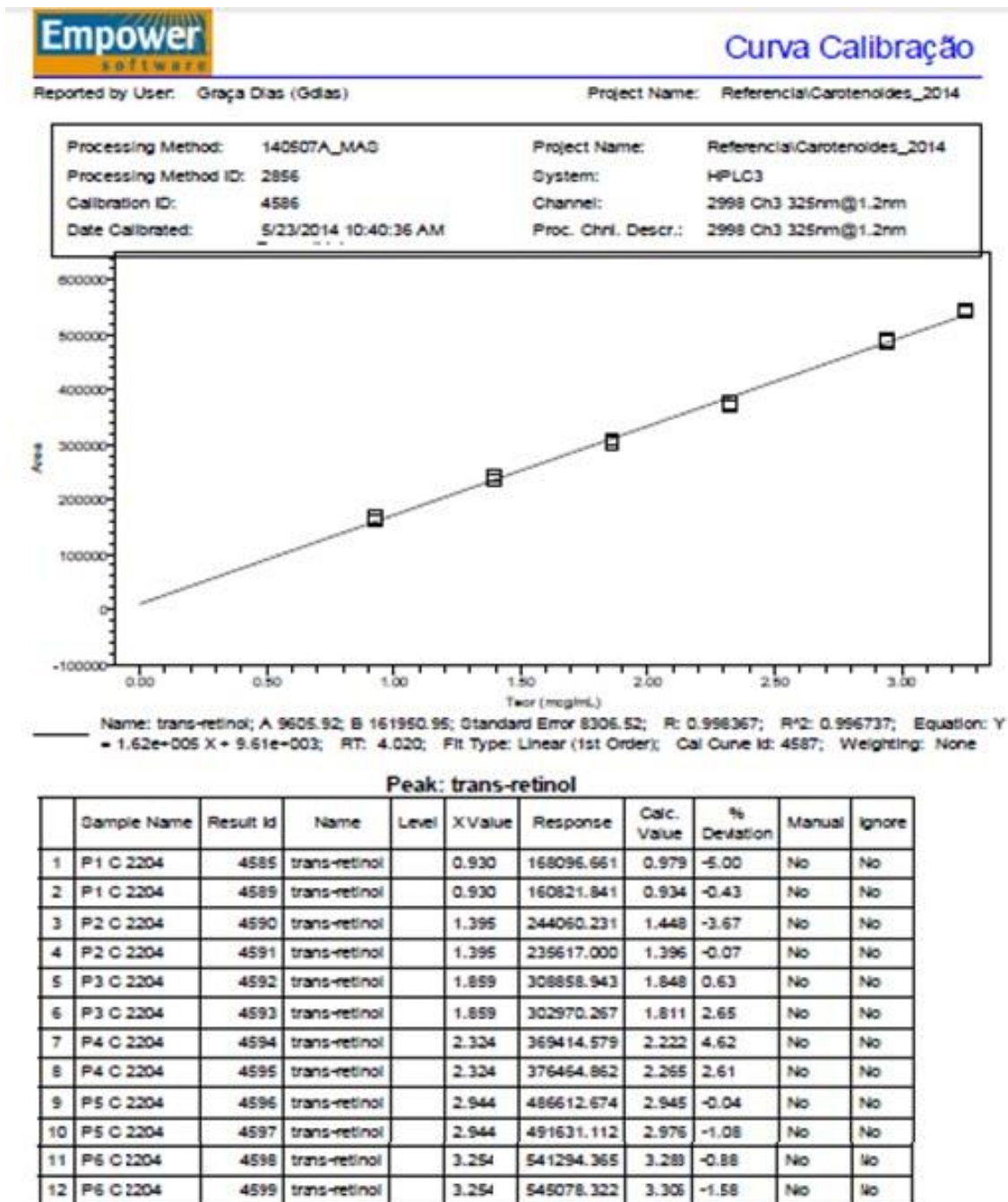


Peak: zeaxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1 C 2204	4681	zeaxantina		0.141	66632.715	0.149	-5.88	No	No
2	P1 C 2204	4706	zeaxantina		0.141	70671.484	0.156	-9.76	No	No
3	P2 C 2204	4696	zeaxantina		1.040	654076.574	1.084	-4.10	No	No
4	P2 C 2204	4700	zeaxantina		1.040	654097.753	1.084	-4.10	No	No
5	P3 C 2204	4699	zeaxantina		2.080	1306750.436	2.123	-2.04	No	No
6	P3 C 2204	4694	zeaxantina		2.080	1299669.570	2.112	-1.53	No	No
7	P4 C 2204	4709	zeaxantina		3.120	1830056.699	2.956	5.54	No	No
8	P4 C 2204	4711	zeaxantina		3.120	1832332.843	2.960	5.41	No	No
9	P5 C 2204	4690	zeaxantina		4.160	2553550.009	4.108	1.27	No	No
10	P5 C 2204	4712	zeaxantina		4.160	2586860.194	4.161	-0.02	No	No
11	P6 C 2204	4693	zeaxantina		5.200	3271944.559	5.251	-0.97	No	No
12	P6 C 2204	4692	zeaxantina		5.200	3325037.440	5.336	-2.54	No	No

Anexo 7

Exemplo de um relatório de construção de uma reta de calibração no programa EMPOWER®



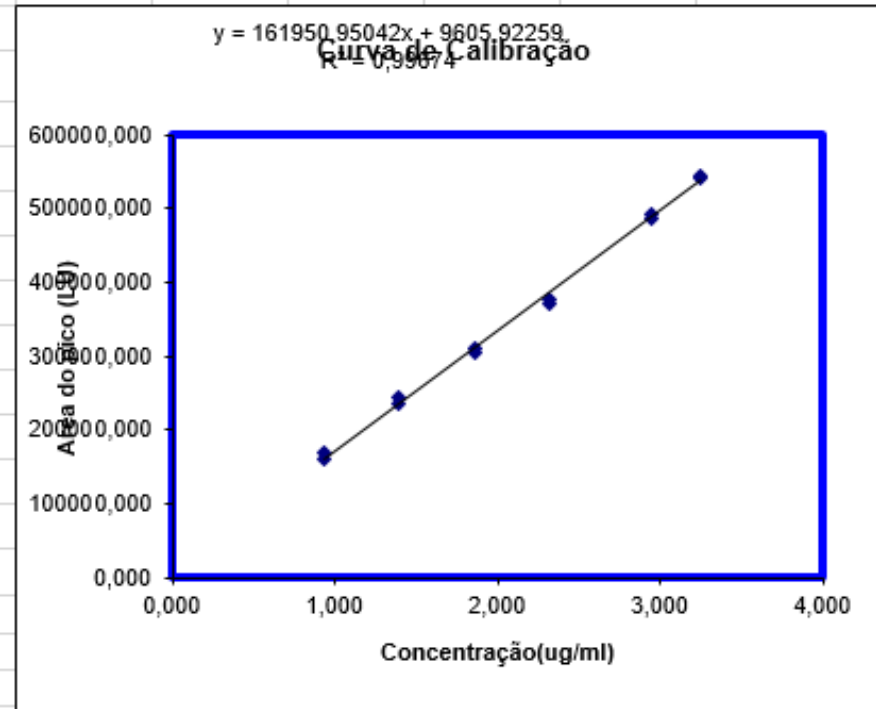
Anexo 8

Folha de cálculo para a introdução dos dados relativos à reta de calibração

Conc.		Sinal (y_{ij} =Área do pico; ensaio j)									
i	x_i (mg/ml)	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	0,930	168096,66100	160433,34100	163632,40100	167654,73000	166120,97100	169618,06000	164251,98100	168562,90000	164691,30100	161005,30000
1	0,930	160821,84100	169011,18100	162074,13500	168839,16100	168454,00000	172056,68000	162852,21100	163039,64100	155571,96100	162672,26100
2	1,395	244060,23100									
2	1,395	235617,00000									
3	1,859	308858,94300									
3	1,859	302970,26700									
4	2,324	369414,57900									
4	2,324	376464,86200									
5	2,944	486612,67400									
5	2,944	491631,11200									
6	3,254	541294,36500	552601,80900	553938,99100	573400,24000	550151,84200	555399,90000	559292,01500	570895,03100	566736,18100	573632,76000
6	3,254	545078,32200	550329,46200	550328,30100	588526,64000	552173,54100	549435,80200	560488,28000	564020,08000	575758,98000	570058,47900

Folha de cálculo referente ao coeficiente de correlação

Concentração (µg/ml)	Área do Pico
0,930	168096,661
0,930	160821,841
1,395	244060,231
1,395	235617,000
1,859	308858,943
1,859	302970,267
2,324	369414,579
2,324	376464,862
2,944	486612,674
2,944	491631,112
3,254	541294,365
3,254	545078,322
Coeficiente de correlação	
R = 0,998367172	
R>0,995 OK	

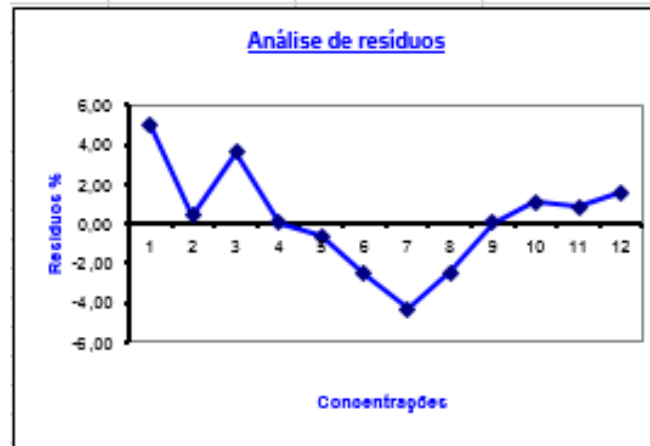


Folha de cálculo para o teste de linearidade (Mandel)

Diferença das variâncias		Valor do teste	
$DS^2 = (N - 2).Sy_1^2 - (N - 3).Sy_2^2$		$PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2}$	
$DS^2 =$	-5,282895450E+11	$PG =$	-8,988260698
F (1,N-3, 99%) = 10,56143105			
PG < F	OK	O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear	
PG > F	.	O ajuste polinomial é significativamente melhor que o linear	

Folha de cálculo da análise de resíduos para os pontos da reta de calibração

Concentração o-x: (µg/ml)	Sinal	Sinal Ajuste Linear-	Resíduos	Critério de aceitação 10%
0,930	168096,66100	160178,19923	4,94	OK
0,930	160821,84100	160178,19923	0,40	OK
1,395	244060,23100	235464,33756	3,65	OK
1,395	235617,00000	235464,33756	0,06	OK
1,859	308858,94300	310750,47588	-0,61	OK
1,859	302970,26700	310750,47588	-2,50	OK
2,324	369414,57900	386038,23371	-4,31	OK
2,324	376464,86200	386038,23371	-2,48	OK
2,944	486612,67400	486418,67180	0,04	OK
2,944	491631,11200	486418,67180	1,07	OK
3,254	541294,36500	536610,51035	0,87	OK
3,254	545078,32200	536610,51035	1,58	OK



Declive (b) = 161950,9504
 Ordenada na
 origem (a) = 9605,9226

Anexo 9

Folha de cálculo para a determinação dos coeficientes de variação para a repetibilidade e para a precisão intermédia

DADOS DE PRECISÃO

Amostras diferentes em dias diferentes - repetibilidade

Dia Data de análise	1	2	3	4	5	6	7	8
				7_05	8_07	9_07	29_5	04_06
Matriz	Carne Porco	Pasteis Nata	Pao Lo	Ovos	Ovos	NIST	NIST	NIST
	4,6679	137,92	258,4	359,8	373,27	122,78	73,45	100,56
	7,6862	71,15	310,35	375,99	421,2	102,9	79,86	106,15
CÁLCULOS								
\bar{x} , médio	6,17705	104,535	284,375	367,895	397,235	112,84	76,655	103,355
s_i	2,1342604	47,21352	36,734197	11,448059	33,891628	14,057283	4,5325545	3,9527269
v_i	4,5550674	2229,1165	1349,4013	131,05805	1148,6425	197,6072	20,54405	15,62405
v_i	1	1	1	1	-1	1	1	1
$v_{média\ rep} (s_r^2)$	466,5439							
Amostras iguais em dias diferentes								
Dia 1	367,895	112,84						
Dia 2	397,235	76,655						
Dia 3		103,355						
Dia 4								
CÁLCULOS								
V_i	430,4178	352,03491						
v_i	1	2						
$V_{média\ entdia}(s_L^2)$	378,16254							
$V_{P_i}(s_{P_i}^2)$	844,70648							
S_r	21,599628							
S_{P_i}	29,063835							
CV_r (%)	11,891883							
CV_{P_i} (%)	13,735531							
r	60,478959							
P_i	81,378737							

Anexo 10

Folha de cálculo para a determinação da incerteza relativa associada à precisão intermédia

DADOS DE PRECISÃO

Preencher as células verdes

			AMOSTRA ANALITO	NIST 2383 <i>Vitamina A</i>		
			Operador	MAS	MAS	MAS
			data de análise			
			série(i)	1	2	3
			n	µg/100 g	µg/100 g	µg/100 g
			1	122,7800	73,4500	100,5600
			2	102,9000	79,8600	106,1500
Média	C _{mi}	µg/100 g		112,8400	76,6550	103,3550
Desvio Padrão	s	µg/100 g		14,05728281	4,532554467	3,952726907
Coefficiente de variação	CV	%		12,45771252	5,912927359	3,824417693
Variância	V	µg ² /(100 g) ²		197,6072	20,54405	15,62405
Desvio padrão da repetibilidade	S _r	µg/100 g		8,82751947		
Coefficiente de variação da repetibilidade	CV _r	%		9,043045385		
Limite da repetibilidade	L _r	µg/100 g		24,71705452		
Desvio padrão da precisão intermédia	S _{pi}	µg/100 g		20,73547705		
Coefficiente de variação da precisão intermédia	CV _{pi}	%		21,24173848		
Limite da precisão intermédia	L _{pi}	µg/100 g		58,05933573		
Incerteza padrão relativa associada à precisão intermédia	u _{r(C)}	µg/100 g		0,212417385		

Folha de cálculo para a determinação da incerteza relativa associada à exatidão

DADOS DE EXACTIDÃO

Preencher as células verdes

Material Referência Certificado	NIST 2383		
Analito	Vitamina A		
Valor Certificado	80,0	µg/100 g	
Incerteza expandida (certificado)	15	µg/100 g	
Incerteza padrão (estimada)*	7,5	µg/100 g	
Data	Operador	µg/100 g	
	MAS	73,5	
	MAS	79,9	
	MAS	100,6	
	MAS	106,1	
	MAS	122,8	
	MAS	102,9	
Média	C_{mi}	µg/100 g	97,6333
Desvio Padrão	s	µg/100 g	18,1023387
Coefficiente de variação	CV	%	18,5411458
Variância	V	µg ² /(100 g) ²	327,694667
z-score**			0,66100454
Incerteza padrão relativa da exactidão	$u_r(Ex)$		0,12049328
Incerteza padrão relativa da exactidão, não considerando a incerteza do MRC	$u_r(Ex)_p$		0,07569391

Folha de cálculo utilizada para a determinação da incerteza expandida relativa combinada

Analito

vitamina A

		Unidades	Incerteza do MRC contabilizada	Incerteza do MRC não contabilizada
Incerteza padrão relativa combinada	$u(C)/C$		0,201830597	0,120285305
Incerteza padrão combinada	$u(C)$	$\mu\text{g}/100\text{ g}$		
Incerteza expandida relativa combinada*	$U(C)/C$		0,403661194	0,240570609
Incerteza expandida combinada*	$U(C)$	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	0	0

Anexo 11

Folha de cálculo para a determinação da vitamina A

PARÂMETRO:	Vitamina A (all-trans retinol e 13-cis retinol)							
NºData de Entrada:	331460		06.05.2014					
Amostra:	NIST 2383							
Observações:	req. 208393							
	all-trans retinol		13-cis retinol		all-trans retinol		13-cis retinol	
AMOSTRA	1	2	1	2	3	4	3	4
Data de início de análise:	29/05/2014							
Executante:	MAS							
Pasta Nº:								
Diluição na técnica	1							
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)								
Resíduos ≤ 10 %	Sim							
Coefficiente correlação (r) ≥ 0,995	Sim							
Toma da amostra (g)	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417
Volume em que a amostra é diluída (mL)	5	5	5	5	05/jan	05/jan	5	5
Diluição posterior	1	1			1	1		
Concentração Sol. Analisadas (µg/ml)	0,0598	0,0565			0,2573	0,2342		
Concentração da Toma de Amostra (µg/100g Amostra)	11,6578	11,1146	#DIV/0!	#DIV/0!	50,15985652	46,07152693	#DIV/0!	#DIV/0!
Concentração média da Amostra (µg/100g Amostra)	11,3862		#DIV/0!		48,1157		#DIV/0!	
repetibilidade (CV, -5%)	OK		#DIV/0!		OK		#DIV/0!	
r (repetibilidade)	1,5941		#DIV/0!		6,7362		#DIV/0!	
Concentração total de Vitamina A (µg/100g Amostra)	#DIV/0!				#DIV/0!			
Data de fim de análise								
Resultado Final:	Validação (Rubrica e data):							
Confirmação (Rubrica e data):								

Folha de cálculo para a determinação da vitamina E

PARÂMETRO:	Vitamina E (di-alfa-tocoferol)	
Nº/Data de Entrada:	331460	06.05.2014
Amostra:	NIST 2383	
Observações:	Req. 208393	

Toma de Amostra	1	2	3	4
Data de Início de análise:	29/05/2014			
Executante:	MAS			
Pasta Nº:	09_2014			
Diluição na técnica	1			
Retas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)				
Resíduos ≤ 10 %	Sim			
Coefficiente correlação (r)≥0,995	Sim			
Toma da amostra (g)	2,5648	2,5417	2,5648	2,5417
Volume em que a amostra é diluída (mL)	5	5	5	5
Diluição posterior	1	1	1	1
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	3,0616	3,6942	7,2172	6,9546
Concentração da Toma de Amostra (mg/100g amostra)	0,5968	0,7267	1,4070	1,3681
Concentração Média da Amostra (mg/100g Amostra)	0,6618		1,3875	
repetibilidade (CV)≤5%	Repetir		OK	
⊂(repetibilidade)	0,0926		0,1943	
Concentração Média de Acetato de alfa-tocoferol (mg/100g Amostra)	0,7265		1,5232	
Data de fim de análise:				