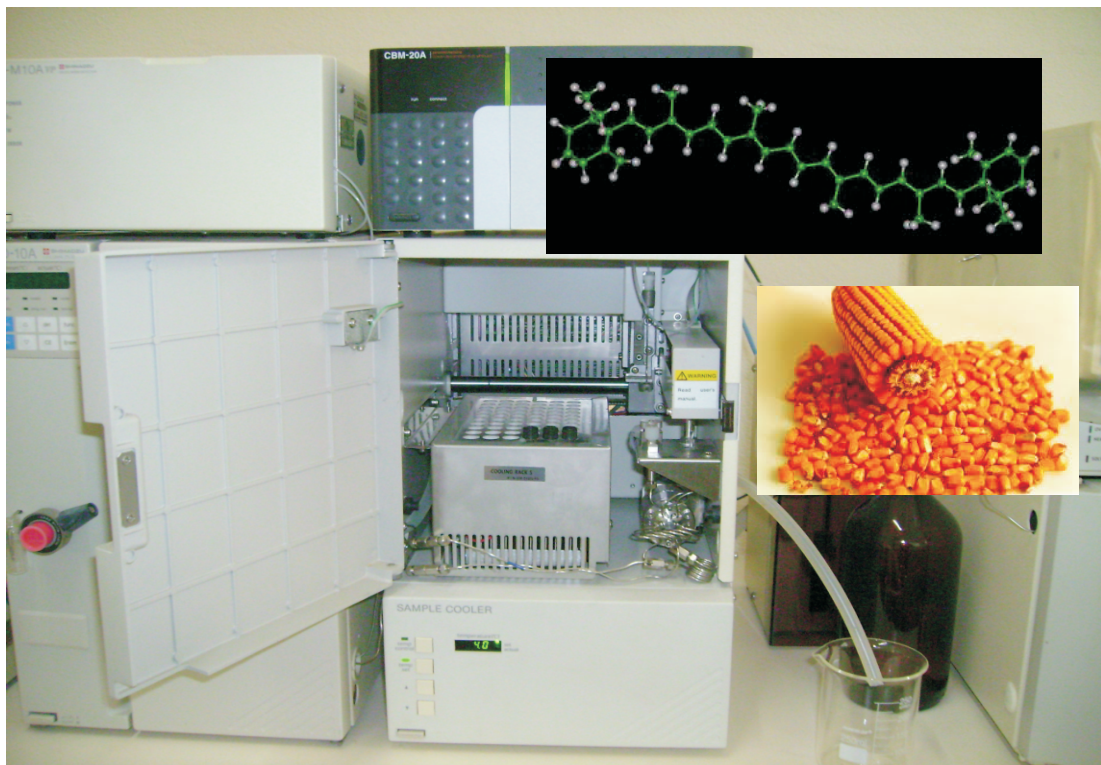


Estabilidade de Carotenoides durante Análises Cromatográficas Utilizando Amostrador Automático com Sistema de Refrigeração



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34

Estabilidade de Carotenoides durante Análises Cromatográficas Utilizando Amostrador Automático com Sistema de Refrigeração

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro
Maria Cristina Dias Paes
Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães
Robert Eugene Schaffert

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro

1ª edição

1ª impressão (2011): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Estabilidade de carotenoides durante análises cromatográficas utilizando amostrador automático com sistema de refrigeração / Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2011.
23 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 34).

1. Caroteno. 2. Análise. 3. Laboratório. 4. Milho. I. Ribeiro, Paulo Eduardo de Aquino. II. Série.

CDD 542.8 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introdução | 7 |
| Material e Métodos | 8 |
| Extração de carotenoides do milho..... | 9 |
| Condições cromatográficas | 10 |
| Teste de estabilidade dos analitos..... | 12 |
| Teste de evaporação do solvente no vial | 13 |
| Resultados e Discussão | 13 |
| Conclusões | 21 |
| Agradecimentos | 22 |
| Referências | 22 |

Estabilidade de Carotenoides durante Análises Cromatográficas Utilizando Amostrador Automático com Sistema de Refrigeração

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro¹

Maria Cristina Dias Paes²

Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães³

Robert Eugene Schaffert⁴

Resumo

Foi adquirido e instalado um sistema de refrigeração para acoplamento ao amostrador automático do cromatógrafo líquido de alta eficiência, visando manter as amostras refrigeradas durante períodos maiores após sua reconstituição, possibilitando, assim, aumentar a capacidade diária de análises sem perda de qualidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência desse novo sistema na manutenção das concentrações de carotenoides de amostras de milho durante o ciclo de um dia de análises. O sistema foi eficiente para manter a estabilidade desses compostos e mostrou-se indispensável na análise de amostras reconstituídas em solventes muito voláteis.

Palavras-chave: caroteno, criptoxantina, cromatografia líquida de alta eficiência, luteína, *Zea mays*, *zeaxantina*.

¹Químico, M.Sc, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG, pauloedu@cnpms.embrapa.br

²Nutricionista, Ph.D., Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG, mcdpaes@cnpms.embrapa.br

³Eng.-Agr., Ph.D., Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG, evaristo@cnpms.embrapa.br

⁴Eng.-Agr., Ph.D., Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG, schaffer@cnpms.embrapa.br

Stability of Carotenoids During Chromatographic Analysis Using Autosampler Coupled to a Cooling System

Abstract

It was purchased and installed a cooling system for the coupling of high performance liquid chromatograph autosampler, aiming to keep the samples refrigerated for longer periods after reconstitution, thus enabling to increase the daily capacity of analysis without loss of quality. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of this new system in maintaining the concentrations of carotenoids in corn samples during the course of a day of analysis. The system was efficient in the stability of these compounds. The use of cooling system proved to be indispensable in the analysis of samples reconstituted in very volatile solvents.

Keywords: carotene, cryptoxanthin, high performance liquid chromatography, lutein, *Zea mays*, zeaxanthin.

Introdução

Carotenoides são importantes pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, produzidos por plantas, algas, leveduras, fungos, bactérias e alguns animais, sendo responsáveis pela coloração do amarelo ao vermelho de hortaliças, frutas, flores, legumes e tubérculos (RAO; RAO, 2007). Nos tecidos fotossintéticos vegetais, os carotenoides exercem a função de absorver luz nos comprimentos de onda em que a clorofila é menos eficiente, e exercem, também, um papel essencial de fotoproteção, atuando como antioxidantes e responsáveis pela eliminação do oxigênio singleto, extremamente reativo e danoso aos componentes celulares, especialmente os lipídeos de membrana celular (DEMMING-ADAMS et al., 1996; McLAREN, 2002).

Do ponto de vista químico, os carotenoides são compostos isoprenoides, geralmente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de duas a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite configurações *cis* e *trans* (FRAZER; BREMLEY, 2004). Ciclização e outras modificações, tais como hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla, redução ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada ou combinação destes processos dão origem a um extenso número de estruturas, geralmente complexas, encontradas na natureza na forma *trans* (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

A classificação dos carotenoides com base na estrutura química os divide em dois grupos: carotenos e xantofilas (ZEB; MEHMOOD, 2004). Os primeiros são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação, enquanto as xantofilas possuem, além de carbono e hidrogênio, também o oxigênio na forma de diferentes grupos como os epóxidos, hidroxílicos, metoxílicos, carbometoxílicos, aldeídicos, cetônicos e carboxílicos. As xantofilas

são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; SHI et al., 1999; AMBRÓSIO et al., 2006).

O sistema de duplas ligações conjugadas das estruturas dos carotenoides confere alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (OLIVER, 2000). Fatores como luz, temperatura, presença de oxigênio e metais estão relacionados à diminuição da estabilidade e favorecimento da degradação desses compostos. A isomerização dá origem a estruturas com menor atividade ou até sem nenhuma função biológica. A oxidação resulta na formação de apocarotenoides, carotenoides com a cadeia carbônica reduzida, que podem sofrer fragmentação, resultando na formação de compostos com baixo peso molecular, similares aos encontrados na oxidação dos ácidos graxos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2006).

A determinação da composição de carotenoides de uma matriz requer análises químicas refinadas, dada a complexidade de suas estruturas. Geralmente a extração é realizada com solventes orgânicos, seguida de aplicação da técnica de cromatografia, que pode ser camada delgada, líquida em coluna aberta ou líquida em cromatógrafo de alta eficiência (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Para evitar erros analíticos, as condições favoráveis à degradação dos carotenoides devem ser eliminadas ou minimizadas com rigor.

No caso do milho, o perfil de carotenoides inclui xantofilas (luteína, zeaxantina e beta-criptoxantina,) e carotenos (alfa e beta carotenos) (CARDOSO et al., 2009), necessitando de diferentes polaridades de solventes durante a análise para ocorrer separação dos analitos. Por essa razão, tanto o processo de extração como a análise são morosos. Visando otimizar o processo, estruturou-se esse estudo

com objetivo de avaliar a estabilidade dos carotenoides extraídos em milho em função da temperatura aplicada durante tempo de espera em amostrador automático com controle de temperatura.

Material e Métodos

Extração de carotenoides do milho

O protocolo de extração de carotenoides foi baseado na metodologia de Kurilich e Jovik (1999), modificada. Amostras de 2 g de grão de milho foram moídas em gral de porcelana Chiarotti 100. O material moído foi pesado em triplicata (0,6000 g) em balança analítica Mettler Toledo AG 245 e transferido para tubos de ensaio com capacidade de 25 mL, com tampa rosqueável. Adicionaram-se aos tubos 7 mL de etanol P.A. contendo 0,1 % de butilidroxitolueno P.A. (BHT) e agitou-se em agitador tipo Vortex Quimis Q 220 por 20 s. Os tubos foram dispostos em banho termostático Marconi MA 127 a 85 °C por 5 min (a tampa dos tubos permaneceu levemente rosqueada, para não explodir o vidro devido à pressão interna). Os tubos foram removidos do banho, adicionaram-se 500 mL de solução de KOH a 80% e agitaram-se os tubos em Vortex por 10 s. Os tubos ficaram em banho termostático por mais 5 min e foram novamente agitados em Vortex. Essa operação foi repetida mais uma vez. Os tubos foram transferidos para banho de gelo em caixa de isopor. Adicionaram-se 4 mL de água deionizada gelada, 4 mL de hexano P.A. e misturou-se o conteúdo usando o Vortex. Os tubos foram centrifugados em centrífuga Jouan B4i a 1200 rpm por 60 s. A fase superior, contendo hexano + carotenoides, foi pipetada usando pipeta tipo Pasteur de vidro e transferida para tubos de ensaio limpos cobertos com papel alumínio, devidamente identificados. Repetiu-se a partição com 4 mL de hexano mais duas vezes, juntando os extratos hexânicos no mesmo frasco com papel alumínio. Adicionaram-se, cuidadosamente para evitar

respingos, 3 mL de água deionizada a cada tubo contendo o extrato de carotenoides e agitaram-se os tubos em Vortex. Os tubos foram deixados em repouso para que ocorresse separação das fases aquosa e hexânica. Quando necessário acelerar a separação, os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 60 s. A fase superior de cada tubo foi coletada e transferida para tubos limpos com fundo cônico. Os carotenoides remanescentes na camada aquosa foram extraídos outras duas vezes, usando 2 a 3 mL de hexano e combinados com a fase orgânica obtida de cada. O extrato contendo hexano foi seco sob atmosfera de nitrogênio gasoso Grau Analítico. O extrato foi reconstituído com adição de 1000 mL de acetona Grau HPLC e misturado em Vortex. Cerca de 500 mL do extrato reconstituído foram transferidos para um vial e esse para o amostrador automático do cromatógrafo líquido de alta eficiência. Dependendo do experimento a ser feito, o sistema de refrigeração do amostrador automático permaneceu desligado ou ligado e estabilizado a 4 °C.

Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em sistema de gradiente, conforme programa mostrado na Tabela 1, utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) marca Shimadzu, modelo LC10A, composto de duas bombas modelo LC 10AD, forno modelo CTO10A, detector UV-vis modelo SPD10A, amostrador automático modelo SIL 10A equipado com sistema de refrigeração modelo SAMPLER COOLER L, coluna cromatográfica marca Waters, modelo YMC® Carotenoid S-3 com dimensões 4,6 x 250 mm, controlador de sistema modelo CBM 20A. O fluxo total de fase móvel foi constante (0,80 mL.min⁻¹), a temperatura do forno foi de 40 °C, a detecção foi realizada utilizando o comprimento de onda de 450 nm, o loop de amostragem foi de 100 mL e o sistema CLAE foi programado e operado utilizando o software Shimadzu LC Solution.

A temperatura do laboratório foi mantida em torno de 21 °C, que será considerada nesse estudo como temperatura ambiente.

Tabela 1. Gradiente de solventes utilizado nas análises de carotenoides.

| Tempo (min) | Proporção de solventes (%) | |
|-------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| | Metanol Grau HPLC | Eter metil terc-butílico Grau HPLC |
| 0,01 | 80 | 20 |
| 5,00 | 80 | 20 |
| 10,00 | 60 | 40 |
| 15,00 | 40 | 60 |
| 20,00 | 20 | 80 |
| 25,00 | 20 | 80 |
| 25,01 | 80 | 20 |
| 30,00 | 80 | 20 |
| 39,00 | Parada | |
| 42,00 | Estabilização para a análise seguinte | |

Para quantificação dos carotenoides, foram montadas curvas de calibração utilizando padrões extraídos de mistura de padrões obtidos de milho-verde (luteína, zeaxantina e beta-criptoxantina) e de cenoura (alfa e beta-carotenos) e purificados por cromatografia preparativa. As massas de cada analito nos pontos da curva são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Curvas de calibração de carotenoides.

| Ponto da Curva | Massa de carotenoide detectada (μg) | | | | |
|----------------|--|---------------|--------------------|---------|------------|
| | Alfa-caroteno | Beta-caroteno | Beta-criptoxantina | Luteína | Zeaxantina |
| 1 | 0,000750 | 0,0125 | 0,00250 | 0,0150 | 0,0241 |
| 2 | 0,00150 | 0,0250 | 0,00500 | 0,0300 | 0,0481 |
| 3 | 0,00300 | 0,0500 | 0,0100 | 0,0600 | 0,0962 |
| 4 | 0,00600 | 0,100 | 0,0200 | 0,120 | 0,192 |
| 5 | 0,0120 | 0,200 | 0,0400 | 0,240 | 0,385 |
| 6 | 0,0240 | 0,400 | 0,0800 | 0,480 | 0,770 |
| 7 | 0,0480 | 0,800 | 0,160 | 0,960 | 1,54 |
| R ² | 0,99988 | 0,99966 | 0,99989 | 0,99995 | 0,99997 |

R² = Coeficiente de determinação

Testes de estabilidade dos analitos

Para avaliar a eficiência do uso do sistema de refrigeração estabilizado a 4 °C na preservação da concentração dos carotenoides no amostrador automático, foram realizadas 12 extrações de uma mesma amostra segundo o procedimento descrito no item 2.1. Duas dessas amostras foram analisadas de imediato conforme procedimento descrito no item 2.2, para confirmação da presença dos carotenoides a serem avaliados na amostra selecionada. Para eliminar o erro referente à extração, os outros 10 extratos foram combinados para se obter uma amostra composta de aproximadamente 10 mL. Essa amostra composta foi dividida em alíquotas, transferida para 10 frascos tipo *vial* e acondicionadas no amostrador automático acoplado a sistema de refrigeração.

As alíquotas foram analisadas de forma sequencial, a cada 42 minutos, intercaladas a cada três análises com um padrão conhecido de beta-caroteno de 0,0500 μg . Ao final das 10 análises, elas foram repetidas. A última amostra foi analisada após 16 h e 40 min da primeira amostra.

Teste de evaporação do solvente no vial

Tendo em vista a elevada volatilidade do solvente em que as amostras são reconstituídas para análise cromatográfica (acetona), verificou-se que, mesmo armazenada em vial fechado, ocorre notável evaporação em temperatura ambiente. Considerando que a concentração dos carotenoides pode ser afetada por essa perda de volume, foi necessário quantificar as perdas decorrentes de evaporação nos vials quando colocados no amostrador automático, em temperatura ambiente e em refrigeração a 4 °C.

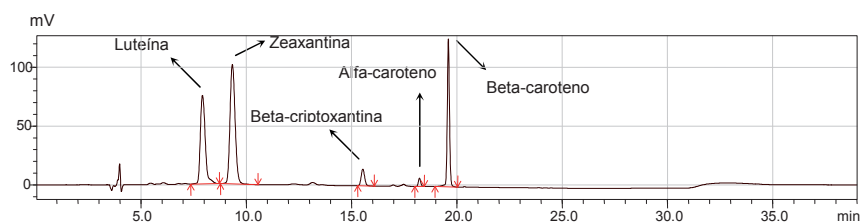
Para isso, foram realizadas pesagens de vials previamente tarados contendo 500 mL de acetona ao longo de 24 horas, que seria o tempo máximo de espera no amostrador automático para uma amostra, após reconstituída, ser analisada. Em um dos testes, o horário de início foi 14:00, simulando o horário real de início das análises cromatográficas em uma rotina normal, após utilizar o período da manhã para realizar as extrações das amostras.

Resultados e Discussão

Os tempos de retenção e os espectros UV-vis obtidos para cada analito são mostrados na Tabela 3 e nas Figuras 1 e 2.

Tabela 3. Tempos de retenção obtidos para os carotenoides nas condições de trabalho utilizadas.

| Carotenoide | Tempo de retenção (min) |
|--------------------|-------------------------|
| Alfa-caroteno | 18,22 |
| Beta-caroteno | 19,59 |
| Beta-criptoxantina | 15,53 |
| Luteína | 7,91 |
| Zeaxantina | 9,33 |

**Figura 1.** Cromatograma dos padrões de carotenoides extraídos de vegetais.

Uma primeira avaliação qualitativa dos cromatogramas nas diferentes temperaturas de teste (amostrador a 4 °C e em temperatura ambiente – Figura 3) demonstrou que, em ambos casos, não houve aparecimento de novos picos na última análise sequencial (B e D) quando comparados com a análise no tempo zero (A e C, respectivamente), sendo uma primeira indicação da estabilidade dos carotenoides analisados. Assim, no período do teste, tanto a 4 °C quanto em temperatura ambiente, não houve desenvolvimento de novas substâncias detectáveis resultantes da degradação térmica ou fotoquímica dos carotenoides analisados, resultado em parte atribuído à presença de BHT como conservante.

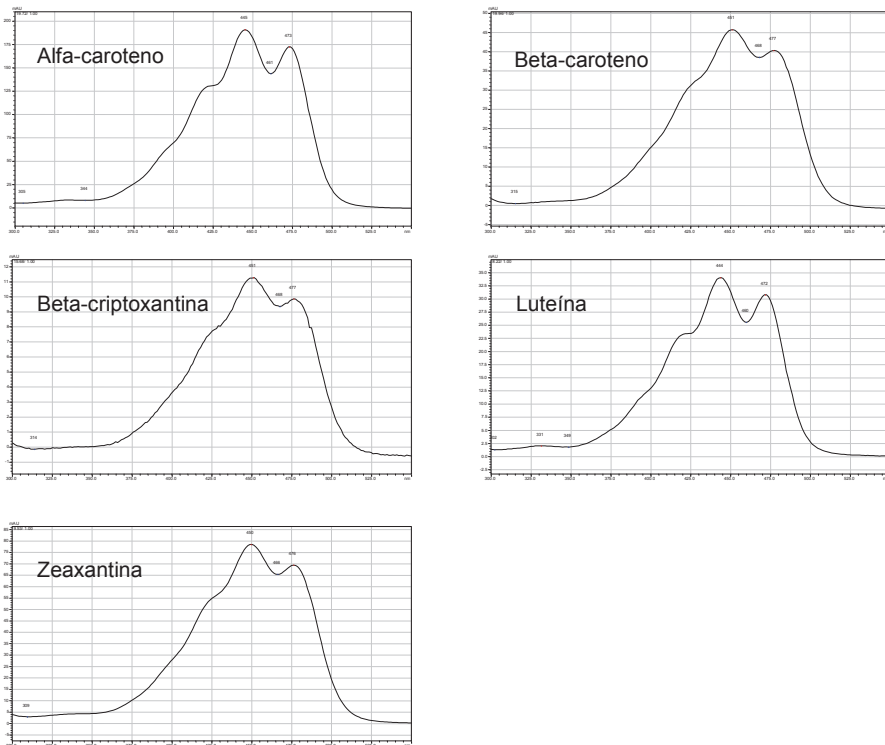
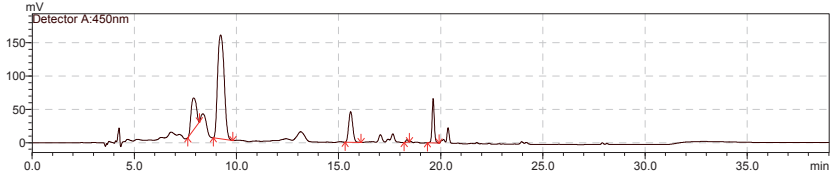
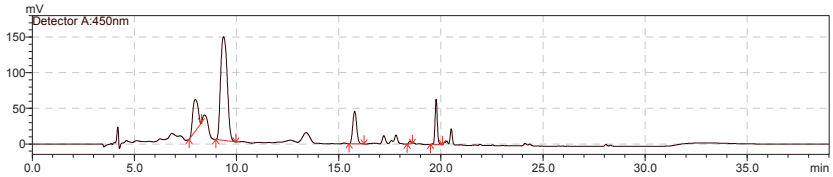


Figura 2. Espectros UV-visível dos padrões de carotenoides extraídos de vegetais.

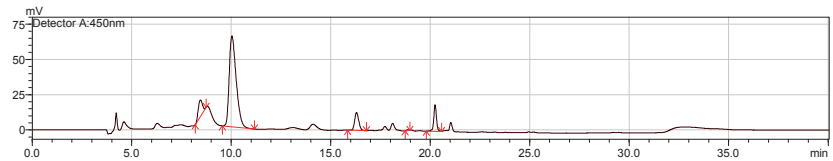
A



B



C



D

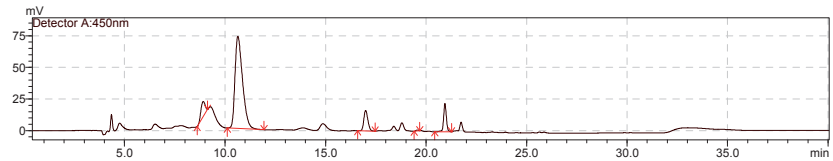


Figura 3. Cromatogramas de amostras compostas de carotenoides extraídos de milho: A – análise inicial com sistema de refrigeração a 4 °C; B – análise após 16 h e 40 min com sistema de refrigeração a 4 °C; C – análise inicial em temperatura ambiente; D – análise após 23 horas em temperatura ambiente. Os dois testes foram realizados em dias diferentes e com extrações de amostras diferentes.

Do ponto de vista quantitativo, verificou-se que, utilizando o sistema de refrigeração do amostrador a 4 °C, obteve-se uma excelente estabilidade de todos os carotenoides analisados (Figura 4), sendo que a redução média na concentração deles foi de 1,3% ao final do teste, variando de 0,35 a 2,1% dependendo do analito. Para se obter esse resultados, foram comparadas as médias das cinco últimas análises, realizadas entre 792 e 1000 minutos, com a média das cinco primeiras análises, realizadas entre 0 e 209 minutos. Com esse procedimento, reduziram-se as pequenas variações ocorridas em função dos erros analíticos de uma corrida para a outra.

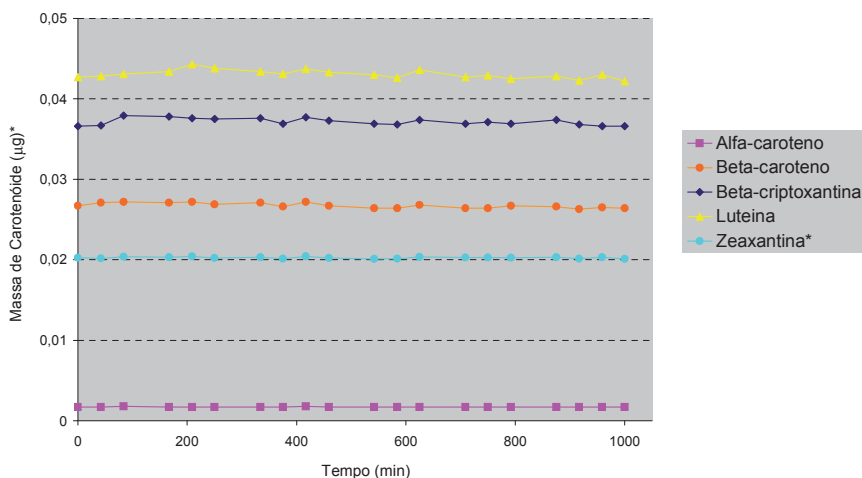


Figura 4. Estabilidade da massa de carotenoides detectada durante análise sequencial de amostra composta em amostrador automático refrigerado a 4 °C. *Para melhor visualização dos dados no gráfico, a massa de Zeaxantina foi dividida por 10.

Tabela 4. Concentrações de carotenoides durante análises sequenciais de amostra composta utilizando sistema de refrigeração do amostrador automático a 4 °C.

| Nº Análise | Horário da Análise* | Tempo (min) | Massa de carotenoide detectada (µg) | | | | | Variação Média (%) |
|--|---------------------|-------------|-------------------------------------|---------------|--------------------|---------|------------|--------------------|
| | | | Alfa-caroteno | Beta-caroteno | Beta-criptoxantina | Luteína | Zeaxantina | |
| 1 | 15:16 | 0 | 0,0017 | 0,0267 | 0,0366 | 0,0427 | 0,2024 | |
| 2 | 15:58 | 42 | 0,0017 | 0,0271 | 0,0367 | 0,0428 | 0,2018 | |
| 3 | 16:40 | 84 | 0,0018 | 0,0272 | 0,0379 | 0,0431 | 0,2037 | |
| 4 | 18:03 | 167 | 0,0017 | 0,0271 | 0,0378 | 0,0434 | 0,2031 | |
| 5 | 18:45 | 209 | 0,0017 | 0,0272 | 0,0376 | 0,0443 | 0,2042 | |
| Média 1 a 5 | | | 0,0017 | 0,0271 | 0,0373 | 0,0433 | 0,2030 | |
| 6 | 19:26 | 250 | 0,0017 | 0,0269 | 0,0375 | 0,0438 | 0,2022 | |
| 7 | 20:50 | 334 | 0,0017 | 0,0271 | 0,0376 | 0,0434 | 0,2031 | |
| 8 | 21:31 | 375 | 0,0017 | 0,0266 | 0,0369 | 0,0431 | 0,2013 | |
| 9 | 22:13 | 417 | 0,0018 | 0,0272 | 0,0377 | 0,0437 | 0,2041 | |
| 10 | 22:55 | 459 | 0,0017 | 0,0267 | 0,0373 | 0,0433 | 0,2021 | |
| Média 6 a 10 | | | 0,0017 | 0,0269 | 0,0374 | 0,0435 | 0,2026 | |
| 11 | 00:18 | 542 | 0,0017 | 0,0264 | 0,0369 | 0,043 | 0,2012 | |
| 12 | 01:00 | 584 | 0,0017 | 0,0264 | 0,0368 | 0,0426 | 0,2016 | |
| 13 | 01:41 | 625 | 0,0017 | 0,0268 | 0,0374 | 0,0436 | 0,2035 | |
| 14 | 03:05 | 709 | 0,0017 | 0,0264 | 0,0369 | 0,0427 | 0,2028 | |
| 15 | 03:46 | 750 | 0,0017 | 0,0264 | 0,0371 | 0,0429 | 0,2029 | |
| Média 11 a 15 | | | 0,0017 | 0,0265 | 0,0370 | 0,0430 | 0,2024 | |
| 16 | 04:28 | 792 | 0,0017 | 0,0267 | 0,0369 | 0,0425 | 0,2025 | |
| 17 | 05:51 | 875 | 0,0017 | 0,0266 | 0,0374 | 0,0428 | 0,2033 | |
| 18 | 06:33 | 917 | 0,0017 | 0,0263 | 0,0368 | 0,0423 | 0,2015 | |
| 19 | 07:15 | 959 | 0,0017 | 0,0265 | 0,0366 | 0,0430 | 0,2032 | |
| 20 | 07:56 | 1000 | 0,0017 | 0,0264 | 0,0366 | 0,0422 | 0,2011 | |
| Média 16 a 20 | | | 0,0017 | 0,0265 | 0,0369 | 0,0426 | 0,2023 | |
| Variação entre a última e a primeira média (%) | | | -1,2 | -2,1 | -1,2 | -1,6 | -0,35 | -1,3 |

* A análise sequencial iniciou-se no dia 10/02/2011 e encerrou-se no dia seguinte.

Quando os resultados acima foram comparados com os obtidos sem o sistema de refrigeração, observou-se um comportamento inesperado. Em princípio, como tratavam-se de analitos térmica e fotoquimicamente sensíveis, acreditava-se que em temperatura ambiente ocorreria uma considerável redução de suas concentrações ao longo das análises. Entretanto, verificou-se, de um modo geral, aumento na concentração dos carotenoides (Figura 5) de 9,5% em média, variando de 5,6 a 12% dependendo do carotenoide (Tabela 5). Provavelmente isso ocorreu devido à redução do volume da amostra que, em temperatura ambiente, sofreu volatilização da acetona na qual os carotenoides foram reconstituídos.

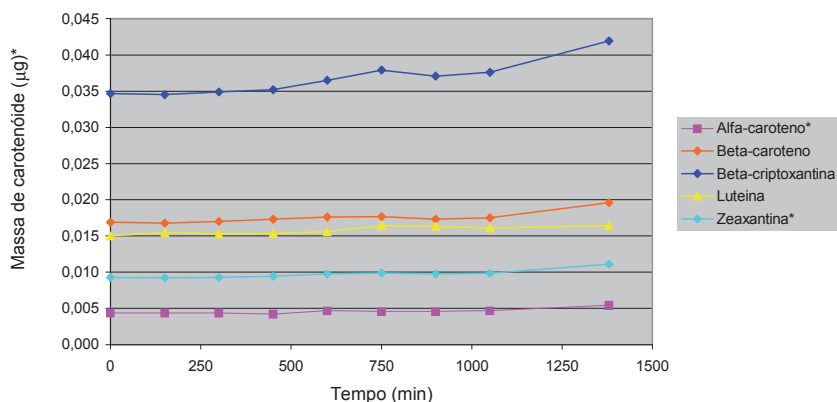


Figura 5. Estabilidade da massa de carotenoides detectada durante análise sequencial de amostra composta em amostrador automático em temperatura ambiente. *Para melhor visualização dos dados no gráfico, a massa detectada de Alfa-caroteno foi multiplicada por 10 e a de Zeaxantina foi dividida por 10.

Tabela 5. Concentrações de carotenoides durante análises sequenciais de amostra composta utilizando amostrador automático em temperatura ambiente.

| Nº Análise | Horário da Análise* | Tempo (min) | Massa de carotenoide detectada (µg) | | | | | Variação Média (%) |
|--|---------------------|-------------|-------------------------------------|---------------|--------------------|---------|------------|--------------------|
| | | | Alfa-caroteno | Beta-caroteno | Beta-criptoxantina | Luteína | Zeaxantina | |
| 1 | 13:20 | 0 | 0,00044 | 0,0169 | 0,0347 | 0,0150 | 0,0927 | |
| 2 | 15:50 | 150 | 0,00044 | 0,0168 | 0,0345 | 0,0155 | 0,0923 | |
| 3 | 18:20 | 300 | 0,00044 | 0,0170 | 0,0349 | 0,0153 | 0,0928 | |
| Média 1 a 3 | | | 0,00044 | 0,0169 | 0,0347 | 0,0153 | 0,0926 | |
| 4 | 20:50 | 450 | 0,00042 | 0,0173 | 0,0352 | 0,0154 | 0,0946 | |
| 5 | 23:20 | 600 | 0,00047 | 0,0176 | 0,0365 | 0,0156 | 0,0977 | |
| 6 | 01:50 | 750 | 0,00046 | 0,0177 | 0,0379 | 0,0164 | 0,0989 | |
| Média 4 a 6 | | | 0,00045 | 0,0175 | 0,0365 | 0,0158 | 0,0971 | |
| 7 | 04:20 | 900 | 0,00046 | 0,0173 | 0,0371 | 0,0163 | 0,0977 | |
| 8 | 06:50 | 1050 | 0,00047 | 0,0175 | 0,0376 | 0,0161 | 0,0986 | |
| 9 | 12:20 | 1380 | 0,00054 | 0,0196 | 0,0419 | 0,0164 | 0,1111 | |
| Média 7 a 9 | | | 0,00049 | 0,0181 | 0,0389 | 0,0163 | 0,1025 | |
| Variação entre a última e a primeira média (%) | | | 11,4 | 7,3 | 12,0 | 6,6 | 10,7 | 9,6 |

* A análise sequencial iniciou-se no dia 10/02/2011 e encerrou-se no dia seguinte.

Para comprovar essa hipótese, foram realizados testes para quantificar a evaporação de acetona nas condições analíticas, ou seja, passando pelo mesmo processo de armazenamento em vial durante o período em que as amostras ficam no amostrador automático aguardando a análise, com e sem o uso do sistema de refrigeração do amostrador. Os resultados desses testes (Figura 6) mostraram que não houve diferença em iniciar as análises no início da manhã ou no início da tarde, mesmo sem o uso do sistema refrigerado, o que demonstra uma boa estabilidade durante dia e noite na temperatura do Laboratório onde o equipamento está instalado. É bem pronunciada a diferença na perda de massa de acetona por evaporação quando não se usa o sistema de refrigeração do amostrador automático (cerca de 11% após um dia) em comparação com o uso do sistema refrigerado a 4 °C (cerca de 2% após um dia). Essa diferença justifica o aumento médio de

9,5% na massa detectada dos carotenoides quando armazenados e analisados sem o uso do sistema de refrigeração do amostrador automático.

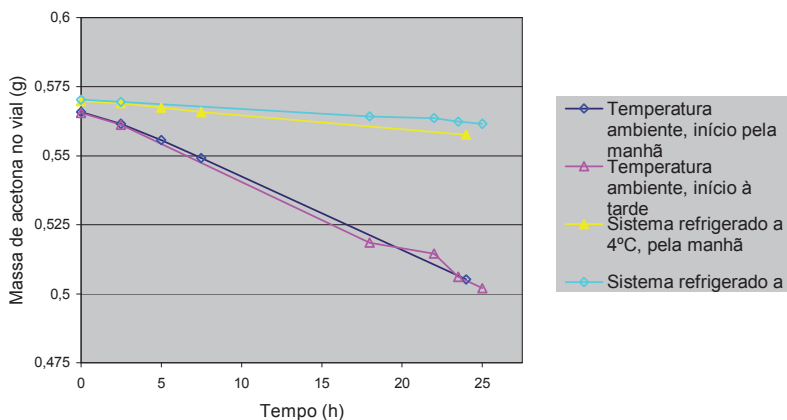


Figura 6. Perda de massa de acetona por evaporação em vial armazenado no amostrador automático

Conclusões

O uso do sistema de refrigeração do amostrador automático mostrou-se eficiente na conservação das concentrações dos carotenoides analisados por CLAE, obtendo-se, após 16 horas e 40 min de reconstituição da amostra, uma redução média de 1,3% em sua concentração, valor aceitável para essas análises. Dessa forma, é possível realizar esse procedimento analítico 24 h por dia, no que se refere à qualidade de resposta do Cromatógrafo.

O sistema de refrigeração mostrou-se indispensável quando é necessário manter uma amostra aguardando análise via amostrador automático por longos períodos de tempos (durante a noite, por exemplo), especialmente quando essa for reconstituída em solvente muito volátil, sob pena de haver superestimação das concentrações dos analitos, em função da redução de volume decorrente da evaporação do solvente.

Agradecimentos

À Embrapa, ao BioFORT, ao HarvestPlus e ao Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto pelo apoio financeiro ao projeto. Ao Assistente Carlos Henrique de Paula Pires pela realização das extrações e análises cromatográficas com dedicação e eficiência.

Referências

AMBRÓSIO, C. L. B.; CÂMARA, F. A.; CAMPOS, S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

CARDOSO, W. S.; PAES, M. C. P.; GALVÃO, J. C. C.; RIOS, S. A.; GUIMARÃES, P. E. O.; SCHAFFERT, R. E.; BORÉM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 164-173, 2009.

DEMMIG-ADAMS, B.; GILMORE, A. M.; ADAMS, W. W. In vivo functions of carotenoids in higher plants. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, n. 4, p. 403-412, 1996.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, p. 228-265, 2004.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1948-1955, 1999.

McLAREN, D. S. Vitamin A and its relatives: marvelous molecules in key life processes. **Sight Life Newsletter**, Suíça, v. 3, p. 3-17, 2002.

OLIVER, J. P. A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1, p. 543-555, 2000.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, Essex, v. 5, n. 1, p. 192-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUEZ, E. B.; AMAYA-FARFAN, J. Advances in food carotenoid research: chemical and technological aspects, implications in human health. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 101-121, 2006.

SHI, J.; LE MAGUER, M.; KAKUDA, Y.; LIPTAY, A.; NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomeration in tomato dehydration. **Food Research International**, Barking, v. 32, n. 1, p. 15-21, 1999.

ZEB, A.; MEHMOOD, S. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 3, n. 3, p. 199-204, 2004.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

