



Foto: Rosemar Antoniassi

COMUNICADO
TÉCNICO

235

Rio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2018

Embrapa

Análise Simultânea de Carotenos e Tococromanóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Rosemar Antoniassi¹
Sidney Pacheco²
Adelia Ferreira de Faria-Machado³
Allan Eduardo Wilhelm⁴
Andrea Madalena Maciel Guedes⁵
Humberto Ribeiro Bizzo⁶
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy⁷

Análise Simultânea de Carotenos e Tococromanóis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência¹

¹ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Químico, D.Sc. em Ciência de Alimentos, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Farmacêutico, M.Sc. em Ciência de Alimentos, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁶ Químico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁷ Farmacêutico, D.Sc. em Química, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelo, laranja ou vermelho, presentes não só em frutas e hortaliças como também na gema de ovo, crustáceos cozidos e alguns peixes. Embora presentes em pequenas quantidades, são substâncias bioativas, com efeitos benéficos à saúde, e alguns deles apresentam atividade de vitamina A (Rodriguez-Amaya et al., 2008).

Outra classe de compostos bioativos são os tocoferóis e tocotrienóis, chamados de tococromanóis. De uma maneira geral, estes compostos são encontrados em maior quantidade em óleos e em fontes oleaginosas, como sementes e frutos. Os tococromanóis têm sido muito estudados pela atividade

antioxidante e como vitamina E, sendo que os tocotrienóis chamam a atenção pela atividade anti-inflamatória e possível redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (Sen et al., 2006; Aggarwal et al., 2010).

O valor nutricional destes compostos justifica sua identificação e quantificação nas fontes comestíveis, considerando que tanto os carotenoides como os tococromanóis exibem diferentes atividades vitamínicas e biológicas. Para efeito do cálculo de vitamina A, são considerados apenas o *all-trans* α -caroteno, *all-trans* β -caroteno e a β -criptoxantina. Da mesma maneira os isômeros α , β , γ e δ tocoferóis e tocotrienóis apresentam diferentes atividades como vitamina E (FAO, 2012).

Os carotenoides e os tococromanóis são compostos lábeis, sensíveis ao aquecimento, luz e presença de oxigênio, entre outros fatores. Assim sendo, a extração e a análise destes compostos devem ser realizadas em condições que evitem perdas e degradação.

O método mais utilizado para análise e quantificação destes compostos é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em geral realizada como duas análises distintas. A análise simultânea destes compostos no óleo de palma foi proposta por Puspitasari-Nienaber et al. (2002) com detector eletroquímico, que não é equipamento muito comum. A análise simultânea de carotenoides e de tococromanóis de óleo de híbrido de palma foi realizada por Antoniassi et al. (2017) utilizando-se detector de arranjo de diodos e fluorescência em série, sendo este último detector muito sensível e específico para os tococromanóis. O detector de arranjo de diodos tem sido o mais utilizado para análise de carotenoides, pois permite a identificação destes compostos pela comparação de espectros na região do visível, quando o detector de massas não está disponível (Pacheco et al., 2009).

A separação de carotenoides por CLAE é usualmente realizada em coluna de fase reversa de C_{30} , enquanto que a separação de tococromanóis por CLAE pode ser realizada utilizando-se coluna de fase reversa de C_{18} ou colunas de fase normal (sílica ou sílica-diól), com a vantagem que em fase normal ocorre

separação entre β e γ -tocoferol, e β e γ -tocotrienol. Por outro lado, os solventes utilizados na separação em fase normal são hexano e isopropanol, sendo que o emprego de hexano pode danificar selos e membranas do equipamento. A separação em fase reversa é uma alternativa para a maioria dos óleos que apresentam quantidades muito baixas de β -tocoferol e β -tocotrienol, com a vantagem da utilização dos solventes mais usuais na análise por CLAE, como metanol e acetonitrila.

Neste trabalho, o método de análise por CLAE foi aperfeiçoado para separação de carotenoides e tococromanóis em coluna de fase reversa de C_{30} utilizando-se os detectores de arranjo de diodos e de fluorescência, conectados em série.

Técnicas de extração e preparo de amostra

Para a análise dos carotenoides e tococromanóis pesou-se de 40 a 100 mg de óleo (dependendo da concentração). Para dissolução dos óleos de híbridos de palma e de caiaué utilizou-se 2 mL acetona (com teor máximo de umidade de 5%), que é eficaz para dissolver o óleo.

Análise por CLAE

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Alliance, modelo 2695, da Waters Technologies, equipado com bomba quaternária, desgaseificador

on-line, injetor automático com válvula *Rheodyne* (*Rheodyne LCC*, *Rohnert Park*, *EUA*) e forno externo para coluna cromatográfica, conectado em série com os detectores de arranjo de diodos (*DAD*), *Waters* modelo 2998 e de fluorescência (*FLD*), *Waters* modelo 2424, nesta sequência. A coluna utilizada foi a *YMC C₃₀* (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) condicionada a 35°C, e as amostras foram mantidas a 15°C. O gradiente de eluição utilizado foi o de *Pacheco et al.* (2009) com modificações: a composição inicial da fase móvel foi de 90% de metanol e 10% de *MTBE* (*Metil terc butil éter*) passando para a proporção de 85% de metanol e 15% de *MTBE* em 30 segundos, e em 15 minutos atingindo-se a proporção de 15% de metanol e 85% de *MTBE*. Retornou-se a composição inicial em 1,5 minutos e manteve-se nestas condições até 28 minutos. O fluxo foi de 0,8 mL/minuto e o volume de injeção variou de 5 a 10 µL. Para análise dos carotenóides utilizou-se o detector *DAD* selecionando-se a varredura de 200 a 800 nm e utilizando-se para quantificação o comprimento de onda 450 nm para β -caroteno. Para análise dos tococromanóis utilizou-se o detector de fluorescência (*FLD*) com comprimento de onda de excitação de 290 nm, e de emissão de 330 nm.

Quantificação e identificação

Para amostras de óleo na faixa de 100-300 µg de α -tocoferol/grama de óleo de palma ou híbrido de palma ou caiaué,

preparou-se uma solução estoque de α -tocoferol de 20 mg/50 mL de metanol e diluiu-se na proporção de 1/10 e 1/25 para leitura no espectrofotômetro, e para a análise por *CLAE* a diluição foi de 1/50, com injeção de 1 a 12 µL. Para o cálculo da concentração da solução estoque de α -tocoferol em µg/mL, dividiu-se a absorbância (leitura entre 0,1 e 0,8 no comprimento de onda de 292 nm), pela absorvidade molar de 0,0076 reportado na *AOCS* (2009). Para cada tococromanol, utilizou-se uma curva de calibração de pelo menos 6 pontos, variando-se o volume de injeção de 1 a 12 µL, ou preparando-se soluções distintas, de concentrações compatíveis com o esperado para as amostras. A concentração do padrão foi verificada por espectrofotometria e calculada considerando-se a absorvidade molar e os comprimentos de onda máximos para cada tococromanol (*AOCS*, 2009; *Podda et al.*, 1996).

Para os óleos de palma, híbridos de palma e caiaué, nos quais α e β -caroteno representam mais de 50% dos carotenos totais, a quantificação foi realizada por espectrofotometria considerando os comprimentos de onda, absorvidades molares e o solvente utilizado na diluição, conforme *Davies* (1976). A identificação foi realizada por comparação dos espectros obtidos e os tempos de retenção dos padrões (*Pacheco et al.*, 2009).

Resultados obtidos

Nas condições relatadas, os tococromanóis eluíram entre 5 e 8 minutos, com resolução de 100%. Para a coluna de fase reversa de C_{30} utilizada, a ordem de eluição foi: δ , γ e α -tocotrienol, seguida de δ , γ e α -tocoferol. Para os carotenóides, a eluição ocorreu entre 10 e 15 minutos, sendo que os óleos de híbridos de palma não apresentaram carotenoides oxigenados e carotenos esterificados (Figuras 1 e 2). Nas condições relatadas, os pftalatos eluíram entre as duas classes de compostos e não interferiram com os resultados.

Para os óleos de híbrido de palma e de caiaué foram identificados como carotenóides majoritários o *all-trans*- α -caroteno e o *all-trans*- β -caroteno, variando respectivamente de 240 a 579 $\mu\text{g}/\text{grama}$, e de 328 a 997 $\mu\text{g}/\text{grama}$. A coluna mais utilizada para separação dos carotenoides é a coluna de fase reversa de C_{30} de 25 cm e 4,6 mm de diâmetro interno, sendo que o tamanho de partícula pode ser de 5 ou 3 μm . Para os óleos de palma e de híbridos de palma, que não apresentam uma composição tão complexa de carotenoides, foi utilizada uma coluna de C_{30} com tamanho de partícula de 5 μm .

Esta coluna foi eficaz também na separação dos tococromanóis, sendo que para estes óleos os predominantes foram o γ -tocotrienol (variando de 438 a 1116 $\mu\text{g}/\text{g}$), o α -tocotrienol (variando de 90 a 244 $\mu\text{g}/\text{g}$) e o α -tocoferol (variando

de 95 a 188 $\mu\text{g}/\text{g}$). Este método pode ser utilizado para outros óleos que apresentem quantidades muito baixas de β -tocoferol e β -tocotrienol.

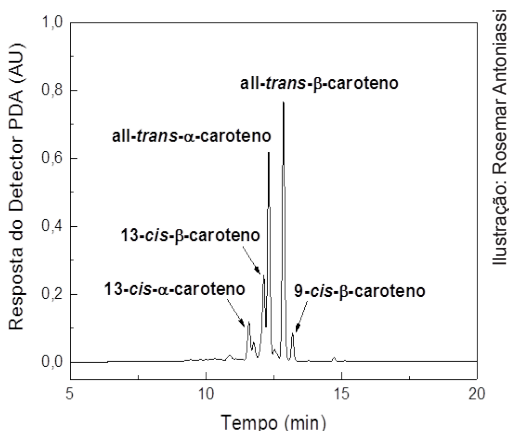


Ilustração: Rosemar Antonias

Figura 1. Cromatograma de carotenóides de óleo de híbrido de palma por CLAE com detector de arranjo de diodos a 450 nm.

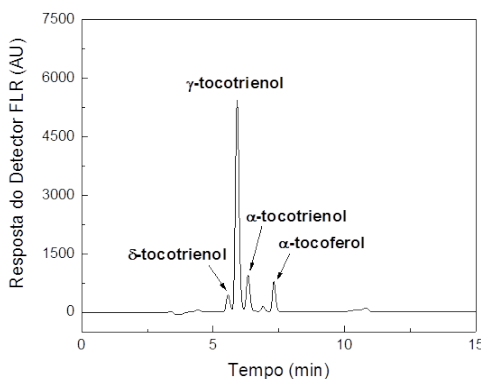


Ilustração: Rosemar Antonias

Figura 2. Cromatograma de tococromanóis de óleo de híbrido de palma por CLAE com detector de Fluorescência (excitação a 290 nm e emissão a 330 nm).

Quanto aos padrões dos tococromanóis que estão disponíveis para aquisição, alguns deles são purificados e outros estão disponíveis em fase oleosa, como é o caso do α -tocoferol. Como estes compostos são muito lábeis é necessário verificar a concentração das soluções de padrão pela leitura espectrofotométrica, utilizando-se a absorvidade molar (AOCS, 2009; Podda et al., 1996). Caso não se tenha todos os padrões para identificação, pode-se utilizar óleos autênticos que apresentem composição característica destes compostos, como por exemplo, soja (α , γ e δ -tocoferol), girassol e oliva (α -tocoferol), palma bruto (γ -tocotrienol), extrato de urucum (δ -tocotrienol) e óleo de gérmen de trigo (β -tocoferol e β -tocotrienol).

Quanto aos padrões de carotenoides, caso não estejam disponíveis, pode-se isolar a partir de fontes ricas nestes compostos, e preparar os padrões no próprio laboratório para então construir curvas analíticas compatíveis com a concentração das amostras, recalculando-se a concentração por espectrofotometria, conforme Pacheco et al. (2009).

O método apresentado foi eficaz na separação das duas classes de compostos para os óleos ou extratos de frutos, e óleos de palma, híbridos de palma e caiaué, e pode ser utilizado para outras matrizes oleosas, como fruto e óleo de buriti e semente de urucum, entre outras fontes. O método é simples,

seletivo e apresentou faixa de trabalho de 8 a 800 $\mu\text{g/g}$ de cada caroteno e de 10 a 1200 $\mu\text{g/g}$ de cada tococromanol. Apresentou redução do tempo de análise, redução do volume de solvente e consequentemente do descarte de resíduos, em relação à realização de duas análises independentes.

Referências

AOCS. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6 ed. Champaign, EUA: AOCS, 2009.

AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 11, p. 1613-1631, 2010.

ANTONIASSI, R.; LOPES, R.; GODOY, R. L. de O.; PACHECO, S.; DOMINGUES, A. F. N.; GOMES JUNIOR, R. A.; WILHELM, A. E.; MACHADO, A. F. de F.; GUEDES, A. M. M.; BIZZO, H. R. Valor nutricional de óleo de híbridos de palma quanto ao teor de carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis. In: ENCONTRO NACIONAL, 20.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 6., 2017. Belém. Segurança e qualidade de alimentos. Belém, PA: LACEN: UFPA, 2017. p. 1-5.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 2. ed. London: Academic Press, 1976. p.38-165.

FAO. INFOODS. Guidelines for Converting Units, Denominators and Expressions (Version 1.0). Rome, Italy: FAO, 2012.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PODDA, M.; WEBER, C.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones. **Journal of Lipid Research**, v. 37, p. 893-901, 1996.

PUSPITASARI-NIENABER, N.; FERRUZZI, M.; SCHWARTZ, S. Simultaneous detection of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls in vegetable oils by direct injection C30 RP-HPLC with coulometric electrochemical array detection. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 7, p. 633-640, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides:** Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília, DF: Ministério de Meio Ambiente, 2008, 100 p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_agrobio/_publicacao/89_publicacao09032009113306.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2018.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2088-2098, 2006.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (2018): 50 exemplares

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Virgínia Martins da Matta

Membros

*André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda
Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro
Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares,
Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel
Freitas Silva e Rogério Germani*

Supervisão editorial

Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto

Marianna Ramos dos Anjos

Normalização bibliográfica

Elizabete Alves de Almeida Soares

Tratamento das ilustrações

André Luis do Nascimento Gomes

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa

Rosemar Antoniassi

CGPE 15000

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

