



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

3 SAÚDE E  
BEM-ESTAR



COMUNICADO  
TÉCNICO

131

Brasília, DF  
Fevereiro 2021

**Embrapa**

# Metodologia para determinação de carotenoides totais e $\beta$ -caroteno em óleo

Iriani Rodrigues Maldonade  
Maria Isabel Ordoñez Lozada  
Livia de Lacerda de Oliveira  
Daniele Bobrowski Rodrigues

# Metodologia para determinação de carotenoides totais e $\beta$ -caroteno em óleo

*Iriani Rodrigues Maldonade<sup>1</sup>*

*Maria Isabel Ordoñez Lozada<sup>2</sup>*

*Livia de Lacerda de Oliveira<sup>3</sup>*

*Daniele Bobrowski Rodrigues<sup>4</sup>*

## Introdução

Os lipídeos são os constituintes de óleos e gorduras, formados principalmente por ácidos graxos na forma de triglicerídeos e outros compostos lipofílicos, sendo que os óleos diferem das gorduras por se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente. Os lipídeos estão presentes nas células animais e são responsáveis por várias funções biológicas, e tem poder calorífico de 9 Kcal/g. Os óleos são primariamente extraídos de sementes com solventes orgânicos a temperaturas elevadas ou por método físico (uso de prensas). Tendo características hidrofóbicas, os óleos são ricos em compostos lipofílicos com propriedades de pró-vitamina A (carotenoides como o  $\beta$ -caroteno) e vitamina E (tocoferóis), que são muito

importantes para à saúde humana. Nas últimas décadas, outras atividades biológicas têm sido vinculadas ao consumo dos carotenoides, como o fortalecimento do sistema imunológico, diminuição do risco de doenças degenerativas, cardiovasculares e oftalmológicas (degeneração macular e catarata).

Os carotenoides são tetraterpenoides (C40) formados por oito unidades isoprenoides (C5) unidos por cauda-cabeça e são responsáveis pela coloração de frutas, hortaliças e microrganismos, cujo espectro de cor varia entre amarelo, laranja e vermelho. Nas plantas, os carotenoides estão associados à clorofila e servem como uma antena para auxiliar na captação de energia solar, que será

---

<sup>1</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

<sup>2</sup> Engenheira agroindustrial, doutoranda em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, DF.

<sup>3</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Nutrição, docente do departamento de Nutrição, Universidade de Brasília, DF.

<sup>4</sup> Farmacêutica, doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora de pós-doutorado em Nutrição, Universidade de Brasília, DF.

usada no processo de fotossíntese (Rodríguez-Amaya; Maldonado, 2019). Esses compostos lipossolúveis se encontram em frutas e hortaliças em diferentes formas físicas de deposição. São classificados como carotenos (hidrocarbonetos, como o  $\beta$ -caroteno) e xantofilas (presença de oxigênio na sua molécula, como a luteína).

Devido à sua complexa estrutura química e a presença de ligações duplas conjugadas, os carotenoides podem sofrer alterações em suas estruturas como ciclização, hidrogenação, desidrogenação, isomerização, oxidação, entre outras. Entretanto, essas modificações geralmente resultam em alterações nas propriedades químicas como intensidade da coloração e nas propriedades antioxidantes ou de pró-vitamina A.

Em óleos de sementes de *Cucurbita maxima*, os carotenoides predominantes são o  $\beta$ -caroteno e a luteína. Para analisar quimicamente os carotenoides, esses devem ser extraídos com solventes da matriz do alimento para posterior leitura em espectrofotômetro e/ou separação por cromatografia líquida. Para tanto, é necessário que os interferentes sejam eliminados antes extração líquida-líquida em éter de petróleo. Os lipídeos saponificáveis, como os triglicerídeos e as clorofilas, são um dos principais interferentes nessas análises de carotenoides, que devem ser removidos ou eliminados antes da

etapa de partição em éter de petróleo, o que torna a análise de carotenoides em óleos e gorduras complexa.

A saponificação é realizada para eliminar os lipídeos interferentes ou indesejáveis durante a análise. Entretanto, essa operação também pode levar à degradação dos carotenoides e, no caso de amostras de óleo, os protocolos encontrados na literatura não são suficientes para eliminar os ácidos graxos sem perdas significativas no conteúdo de carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999). A metodologia empregada por Rodríguez-Amaya e Kimura (2004) para análise de carotenoides em óleo de palma exige uma operação de separação dos lipídeos específica, nem sempre de fácil realização. Além do que, para as amostras de óleos constituídas de ácidos graxos com alto grau de insaturação, a filtração com funil de vidro sinterizado não é eficiente para separar as frações sólidas do óleo, mesmo em temperaturas baixas.

A otimização de métodos analíticos para quantificação de carotenoides é constante nos laboratórios de pesquisa devido à grande variação das matrizes dos alimentos, sendo que o desenvolvimento de métodos é rotineiramente realizado e validado antes dos experimentos. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo estabelecer um método para a quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-Vis e

$\beta$ -caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de óleo.

## Materiais necessários

### Reagentes necessários:

- Acetona P.A.
- Éter de petróleo P.A.
- Hidróxido de potássio
- Sulfato de sódio anidro
- Acetonitrila (grau HPLC)
- Acetato de etila (grau HPLC)
- Metanol (grau HPLC e P.A.)
- Terc-butil-hidroquinona
- Cilindro de Nitrogênio

### Equipamentos e vidrarias:

- Balança analítica
- Centrífuga refrigerada
- Balão volumétrico de 50 mL
- Béquer de 1000 mL
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Frascos de vidro âmbar
- Funil de separação 500 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Cubetas de vidro (4 cm x 1 cm)
- Espectrofotômetro
- Frascos tipo *vial*
- Cromatógrafo líquido – HPLC, com detector de arranjo de diodos (DAD)
- Pipetas automáticas com ponteiros descartáveis

## Preparo de soluções

- Hidróxido de potássio em metanol 10% (p/v)

Dissolver 10 g de hidróxido de potássio em metanol, transferir a solução para balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com metanol. Homogeneizar o conteúdo e armazená-lo em frasco plástico a temperatura ambiente, devidamente etiquetado.

## Protocolo do método

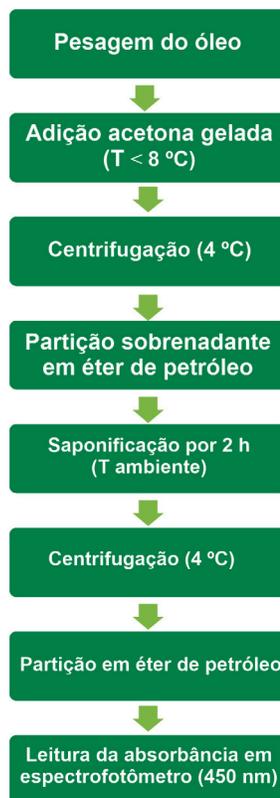
### Preparo da amostra

Em ambiente escuro, pesar 5 g de óleo ou gordura em frasco erlenmeyer (125 mL) e adicionar 25 mL de acetona gelada ( $T < 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) com uma pipeta volumétrica. Agitar a mistura gentilmente e armazená-la em geladeira por 2 h. Após este período, centrifugar a amostra por 10 min a 4000 rpm em temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após a separação, fazer partição do sobrenadante para éter de petróleo em funil de separação de 500 mL, contendo 25 mL de éter de petróleo. Transferir o extrato em acetona para o funil, lentamente pelas paredes, com ajuda de bastão de vidro. Na sequência, a acetona deve ser removida da mistura através de lavagens com água destilada (aproximadamente 2 L). Para tanto, adicionar água destilada cuidadosamente pelas paredes do funil para não formar emulsão, sem agitar. A fase aquosa inferior no funil de separação deve ser desprezada até total remoção da acetona. Recolher a amostra (extrato etéreo) em frasco erlenmeyer recoberto com papel alumínio e tampá-lo.

Posteriormente, a amostra será saponificada por meio da adição de 25 mL de KOH 10% (p/v) em metanol com adição de terc-butil-hidroquinona (0,1%). Armazenar a mistura no escuro por 2 h em temperatura ambiente e, na sequência, centrifugar essa amostra por 30 min a 8000 rpm a 4 °C, recolher o sobrenadante e transferi-lo para funil de separação para fazer nova partição para éter de petróleo como descrito anteriormente. Lavar a amostra com água destilada, descartando a fase aquosa inferior. Repetir esse procedimento até pH neutro (medir pH da água residual). Na última lavagem, descartar a fase inferior (aquosa) completamente, sem perder a fase superior. Secar a saída do funil com papel absorvente e coletar a fase etérea em um erlenmeyer de 50 mL, recoberto com papel alumínio. Adicionar sulfato de sódio anidro (10 a 15 g) para completa remoção da água residual. Transferir a solução e ajustar o volume com éter de petróleo em balão volumétrico para posterior leitura do extrato em espectrofotômetro.

## Quantificação de carotenoides totais

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de, aproximadamente, 2 mL da amostra para cubetas de vidro e realizar a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Utilizar éter de petróleo como solução de referência (branco) para



**Figura 1.** Fluxograma das principais etapas de extração e quantificação de carotenoides em amostras de óleo vegetal. Todo o procedimento deve ser realizado na ausência de luz.

zerar o espectrofotômetro. Pode ser que seja necessário concentrar ou diluir o extrato de carotenoides (absorbância deve ficar entre 0,2 e 0,8). Fazer a leitura da triplicata.

A concentração de carotenoides totais é expressa em micrograma de carotenoides por grama de óleo ( $\mu\text{g/g}$ ), usando a Equação 1 (Davies, 1976).

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{A \times V \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m}$$

(Equação 1)

A = absorvância do extrato em 450 nm

V = volume do balão volumétrico (mL)

m = massa da amostra (g)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  = coeficiente de extinção

( $\beta$ -caroteno = 2592 em éter de petróleo

(Rodríguez-Amaya, 1999))

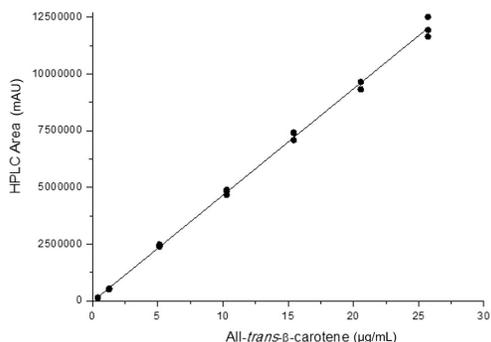
## Curva padrão para quantificação de $\beta$ -caroteno por HPLC

Para construir a curva padrão de  $\beta$ -caroteno, pesar 0,010 mg do padrão de  $\beta$ -caroteno (99% de pureza) e dissolver em 100 mL de éter de petróleo (em balão volumétrico) para preparar a solução mãe. Fazer a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 450 nm, utilizando éter de petróleo como branco, cujos valores da absorvância devem estar na faixa entre 0,2 e 0,8.

Em ambiente escuro, para obter os pontos da curva (pelo menos cinco pontos, em triplicata), transferir alíquotas da solução de  $\beta$ -caroteno para frascos âmbar (por exemplo, 1 mL, 2 mL, 6 mL, 12 mL e 24 mL). Em seguida, secar essas alíquotas usando nitrogênio gasoso e acrescentar 2 mL da mistura acetonitrila:metanol:acetato de etila (8:1:1). Filtrar as amostras (filtro Millex

0,2  $\mu\text{m}$ ) para frascos tipo *vial* e, em seguida, realizar as injeções (10 ou 20  $\mu\text{L}$ ) no HPLC (SHIMADZU) com detector de arranjo de diodos (DAD). A separação dos carotenoides é realizada em coluna Waters C18 Spherisorb de 3  $\mu\text{m}$  de 4,6 x 150 mm, à temperatura de 25 °C. Utilizar como fase móvel uma mistura de acetonitrila:metanol:acetato de etila (8:1:1), sob um fluxo de 0,8 mL/min. O grau de pureza do padrão deve ser igual ou superior a 95%.

Plotar as concentrações de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/mL}$ ) no eixo x e as respectivas áreas dos picos de  $\beta$ -caroteno no HPLC no eixo y (Figura 2) e calcular a equação da reta.



**Figura 2.** Exemplo de curva padrão de  $\beta$ -caroteno.

## Quantificação de $\beta$ -caroteno na amostra por HPLC

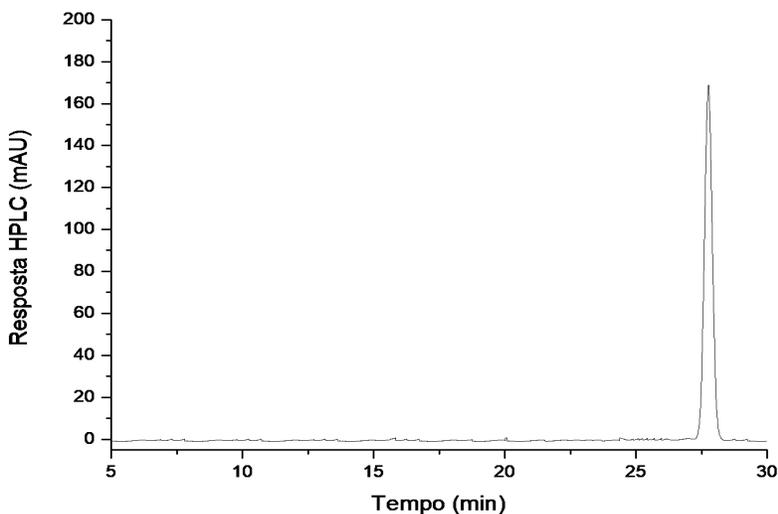
Para a identificação e quantificação de  $\beta$ -caroteno por HPLC-DAD, secar

a amostra (extrato de carotenoides do óleo vegetal) usando nitrogênio gasoso. Suspender essa amostra em 2 mL de acetonitrila:metanol:acetato de etila (8:1:1), filtrar (filtros Millex de PTFE, 022  $\mu\text{m}$ ) em tubos tipo *vial* e fazer a análise cromatográfica no HPLC, nas mesmas condições citadas no item anterior. A Figura 3 mostra um exemplo do cromatograma do  $\beta$ -caroteno na amostra de óleo de semente de *C. maxima*, analisado nas condições descritas acima. A identificação é feita através da comparação do tempo de retenção (em minutos, conforme aparece na Fig. 3) e das características do espectro UV-VIS do pico da amostra com o padrão de  $\beta$ -caroteno.

Calcular a concentração de  $\beta$ -caroteno na amostra de óleo utilizando a equação da reta da curva padrão ( $y = ax + b$ , conforme equação representada na Figura 2), substituindo a área do pico da amostra obtida no HPLC no “y” da equação, para encontrar o “x”, que é a concentração de  $\beta$ -caroteno em  $\mu\text{g/mL}$  (Equação 2). Multiplicar esse valor pelo volume total do extrato (mL), e dividir pelo peso (g) da amostra inicial, para obtenção do teor de  $\beta$ -caroteno em  $\mu\text{g/g}$  (Equação 3), conforme mostrado abaixo:

Após a corrida cromatográfica, fazer as substituições na Equação 2:

$$y = ax - b \quad (\text{Equação 2})$$



**Figura 3.** Cromatograma do  $\beta$ -caroteno em amostra de óleo de semente de moranga (*C. maxima*).

(Equação da curva de  $\beta$ -caroteno representada na Figura 2),

Onde:

$y$  = área

$x$  = concentração de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/mL}$ )

Para cálculo de  $\beta$ -caroteno na amostra de óleo, utilizar a equação abaixo (Equação 3):

Teor de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ )

na amostra =  $\frac{x \cdot V}{m}$  (Equação 3)

Onde:

$x$  = concentração de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V$  = volume do extrato (mL)

$m$  = massa de óleo (g)

## Conclusão

Essa metodologia permite a quantificação de carotenoides por detecção UV/VIS em amostras de óleos, com eliminação de interferentes os ésteres de carotenoides e ácidos graxos, sem degradar os principais carotenoides, devido aos procedimentos de saponificação e separação desenvolvidos nesse trabalho.

## Referências

DAVIES, B.H. Carotenoid. In: GOODWIN, T. W. (ed.), **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. New York: Academic Press, 1976. p. 38-165.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis**. [s.l.]: International Life Sciences, Institute Press, 1999. p. 64.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvest plus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC: International Food Policy Research Institute e International Center for Tropical Agriculture, 2004. p. 58.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; MALDONADE, I. R. Potentials and challenges in the production of microalgal pigments with reference to carotenoids, chlorophylls, and phycobiliproteins. In: RAVISHANKAR, G. A.; AMBATI, R. R. (Ed.). **Handbook of algal technologies and phytochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 109-118.

Exemplares desta publicação  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Hortaliças**

Rodovia BR-060,  
trecho Brasília-Anápolis, km 9  
Caixa Postal 218  
Brasília-DF  
CEP 70.275-970  
Fone: (61) 3385.9000  
Fax: (61) 3556.5744  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)

1ª edição

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Hortaliças

Presidente

*Henrique Martins Gianvecchio Carvalho*

Editora Técnica

*Flávia M. V. T. Clemente*

Secretária

*Clidineia Inez do Nascimento*

Membros

*Geovani Bernardo Amaro*

*Lucimeire Pilon*

*Raphael Augusto de Castro e Melo*

*Carlos Alberto Lopes*

*Marçal Henrique Amici Jorge*

*Alexandre Augusto de Moraes*

*Giovani Olegário da Silva*

*Francisco Herbeth Costa dos Santos*

*Caroline Jacome Costa*

*Iriani Rodrigues Maldonade*

*Francisco Vilela Resende*

*Italo Moraes Rocha Guedes*

Normalização Bibliográfica

*Antonia Veras de Souza*

Tratamento de ilustrações

*André L. Garcia*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*André L. Garcia*

Fotos da capa

*Susanne Jutzeler - Pixabay*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

