

UMA TÉCNICA PARA AVALIAÇÃO DE α , β -CAROTENO E LICOPENO EM MATERIAL VEGETAL*

George Henrique Kling de Moraes**
Walter Brune
José Cambraia

1. INTRODUÇÃO

A vitamina A é considerada constituinte essencial na alimentação animal em virtude de não ser armazenada nem biossintetizada pelo organismo. Sua suplementação contínua é, então, necessária para satisfazer as exigências diárias.

Frutas e hortaliças constituem boa fonte de vitamina A. Entretanto, vegetais a contêm sob forma de caroteno, ou sejam provitaminas A.

Distinguem-se vários carotenos, sendo discutida sua qualidade como provitamina A (5,6). De qualquer modo, de todas, o β -caroteno representa a provitamina A mais eficiente. Assim, a riqueza de um material vegetal em β -caroteno é o melhor critério de sua classificação como fonte de vitamina A. Outrossim, o teor em β -caroteno dos alimentos é fator importante para se poder apreciar seu valor nutritivo.

A avaliação de carotenos baseia-se em métodos biológicos (1, 10), químicos (4, 5) e físicos (2, 11, 12). Mas a determinação é dificultada por sua instabilidade diante de certos agentes, tais como oxigênio (3), luz (11, 12) e aquecimento (6, 9).

A separação de carotenos, licopeno e xantofilas, dos demais componentes encontrados em material vegetal, é facilmente conseguida por definidos sistemas de solventes orgânicos, propostos por vários autores (1, 3, 5, 6 e 13). A escolha entre estes sistemas depende da finalidade analítica e em parte prevê saponificações (3, 6 e 12).

Para a separação de α e β -caroteno de licopeno e outros constituintes lipossolúveis tem sido usada a coluna cromatográfica, aplicando-se sistemas de solventes de polaridade defi-

* Projeto de Pesquisa nº 13/71 do Conselho de Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa, aprovado em 16-10-71.

Aceito para publicação em 17-12-1973

** Respectivamente, Auxiliar de Ensino e Professor Titular do Departamento de Química e Professor Assistente do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Viçosa.

Os autores agradecem ao Engº agrº Dr. N.R. Leal (IPEACS) e ao Departamento de Fitotecnia (U.F.V.) os frutos de tomate cedidos para o presente estudo.

nida. Tem-se preferido a coluna com alumina e outros adsorventes de caráter aproximadamente neutro (2, 3, 5, 7, 12 e 13). A polaridade do sistema de solventes é de fácil controle pela aplicação de acetona, butanol e outros solventes, com os quais se consegue extrações seletivas (1, 5, 6 e 13). A separação por cromatografia de partição (1, 8 e 12) tem também tido ampla aceitação.

Os métodos para avaliação de β -caroteno nem sempre são de execução suficientemente fácil para permitir sua utilização em forma rotineira.

O propósito deste estudo é apresentar uma técnica de rotina que permita avaliar o teor em β -caroteno e distingui-lo analiticamente de α -caroteno e licopeno, este último sendo constituinte abundante em tomate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Utilizamos para o estudo amostras de tomate, cenoura e abóbora, todos provenientes do mercado de Viçosa. Ainda foram usadas amostras de alguns cultivares de tomate de procedência variada.

2.2. Métodos

Após os ensaios preliminares, elaboramos uma técnica de avaliação que consiste das seguintes etapas:

Extração. Uma porção adequada de material logo depois de dar entrada no laboratório, foi pesada (peso p, em gramas) e liquidificada com definida quantidade (volume v_1 , em mililitros) de éter de petróleo pesado, recente-destilado (fração entre 70 a 90°C). O extrato foi colocado em frasco erlenmeyer e conservado no escuro, hermeticamente fechado com películas de parafilme.

Preparo da Coluna. A coluna consistia de um tubo (1 cm x 20 cm) contendo alumina com sulfato de sódio anidro (97 + 3), e, em ambas as extremidades, camadas de sulfato de sódio anidro de 1 cm, aproximadamente.

Fracionamento. Uma alíquota de extrato (v_2 , ml) foi fracionada na coluna sem aumentar a polaridade do solvente. As frações foram conservadas no escuro até sua medição no espectrofotômetro. Por ocasião da análise foi medido o volume do eluato (v_3 , ml).

Leituras. As medições foram feitas em comprimentos definidos, utilizando-se espectrofotômetro Zeiss, PMQ II.

2.3. Cálculo

O cálculo dos teores foi baseado nas extinções unitárias observadas por outros (5) e em valores nossos, experimentalmente apurados. Deste modo, resultaram as fórmulas válidas para os teores de:

$$\alpha\text{-caroteno: } \frac{(1,42 \cdot E_{460} - E_{445}) v_3 \cdot v_1}{1,05 \cdot d \cdot v_2 \cdot p} \text{ mg\%}$$

$$\beta\text{-caroteno: } \frac{(E_{445} - 0,99 \cdot E_{460}) \cdot v_3 \cdot v_1}{0,81 \cdot d \cdot v_2 \cdot p} \text{ mg\%}$$

$$\text{Licopeno: } \frac{E_{473} \cdot v_3 \cdot v_1}{3,56 \cdot d \cdot v_2 \cdot p} \text{ mg\%}$$

onde 'E' expressa as extinções, em %, no comprimento de onda individualmente especificado, e 'd' indica a espessura da cuba, em cm, do espectrofotômetro. Os demais símbolos já foram definidos anteriormente.

3. RESULTADOS E CONCLUSÕES

3.1. Carotenos

3.1.1. Espectro de Absorção de β -caroteno Autêntico

O espectro de β -caroteno puro em éter de petróleo pesado comparado com o obtido em éter de petróleo leve (5) consta da figura 1.

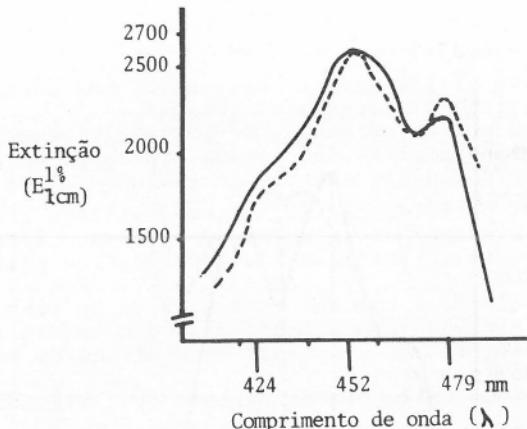


FIGURA 1 - Espectro de Absorção de β -Caroteno em Éter de Petróleo Leve (—) e Pesado (---).

Em razão das concentrações extremamente baixas, a comparação com valores oferecidos pela literatura só poderia ser qualitativa. Para efeito de uniformização escolhemos o valor da extinção máxima em 452 nm. A comparação evidenciou que as posições das características - o perfil, em especial λ_{\max} , extinções e ombros - do espectro são do mesmo comprimento, e as extinções são iguais dentro de 10%.

3.1.2. Espectros de α e β -caroteno nos Eluatos

Na extração dos carotenos do material natural contávamos com outros solutos de difícil separação, além de α -caroteno

(12). Realmente, os eluatos não acusaram separação dos dois carotenos em apreço.

O espectro de β -caroteno autêntico, em comparação com o de α -caroteno, conforme indicado pela literatura, é representado na figura 2.

Os dois espectros, conforme o comprimento, apresentam extinções bem diferentes. Esta informação nos animou a valer das diferenças entre os dois espectros para calcular o teor em α e β -caroteno. Os dois comprimentos escolhidos para este fim foram 445 e 460 nm. Ainda havia dúvida sobre a presença de outros constituintes, 'impurezas', que interferissem nas medições. Assim, desenvolvemos dois 'critérios de impureza', baseados no fato de que α e β -caroteno têm espectros com 3 comprimentos de extinção iguais: 438, 448 e 468 nm em soluções de concentração percentual igual.

Os valores das extinções em dois comprimentos, 445 e 460 nm, só permitem calcular o teor de α e de β -caroteno em eluatos não contaminados com impurezas. Ainda, os 3 valores da extinção em 438, 448 e 468 nm permitem comprovar a hipótese de pureza. Para este efeito, estabelecemos duas fórmulas como critério de impurezas:

$$i_1 = |E_{438}/E_{448} - 0,85| \%$$

$$i_2 = |E_{468}/E_{448} - 0,87| \%$$

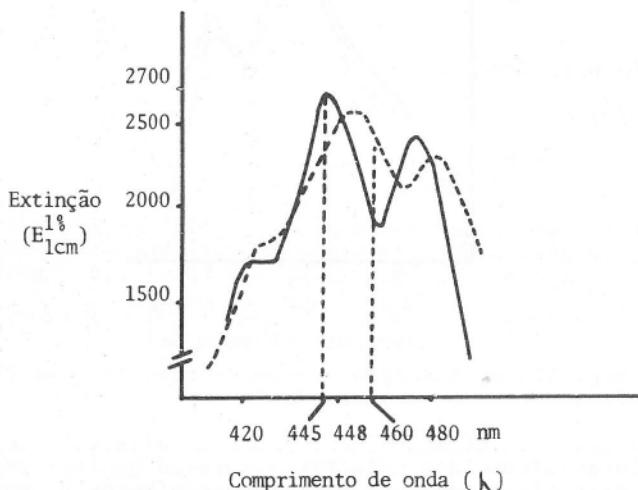


FIGURA 2 - Espectros de Absorção de β -caroteno (---) e α -caroteno (—).

Vale lembrar que as impurezas (i_1 ou i_2), assim expressas, não podem revelar o teor molar por falta de mais informações. As fórmulas representam apenas um critério relativo. Ambas têm o mesmo valor informativo.

3.1.3. Teor de α e β -caroteno em Hortalícias

No material de natureza diversa, analisado para este fim, percebemos que o eluato continha β -caroteno e quantidade variável de α -caroteno (quadro 1).

QUADRO 1 - Teores Relativos* de α -caroteno e Impurezas de definição i_1 e i_2 **.

Frutos	α -caroteno	i_1	i_2
Tomate	0	3	2
Cenoura	15	0	2
Abóbora	23	0	4

*) β -caroteno = 100%

**) $i_1 = |E_{438}/E_{448} - 0,85| \%$

$i_2 = |E_{468}/E_{448} - 0,87| \%$

As quantidades de impurezas, segundo este quadro, são pequenas, se não nulas.

3.1.4. Efeito da Luz na Destruição do Caroteno

De acordo com as citações, os carotenos são facilmente destruídos pela ação da luz. No presente estudo foi usado apenas o tomate para averiguarmos a conservação do nosso eluato.

Sendo possível o aparecimento de outros componentes, impurezas, que surgissem da destruição do caroteno, medimos as extinções em dois comprimentos, 452 e 479 nm (λ_{max}) (quadro 2).

QUADRO 2 - Efeito da luz na destruição do β -caroteno em tomate.
As cifras representam valores relativos de densidade ótica.

Tempo	Claro		Escuro	
	452 nm	479 nm	452 nm	479 nm
0	100		100	
6	78	75	101	102
24	74	72	112	109
48	58	59	121	122

Quando o eluato foi submetido à ação da luz, nas condições de laboratório, os valores obtidos sugeriram uma diminuição proporcional das extinções em ambos os comprimentos. O espec-

tro, dentro da faixa observada, não diferiu qualitativamente do original, mostrando que a destruição no cloro não é acompanhada pelo aparecimento de algum composto que interferisse na faixa em observação.

Os valores no escuro revelam tendência ascendente. Não encontramos explicação satisfatória para esta observação.

3.1.5. Teor de α e β -caroteno de Vários Cultivares de Tomate

As amostras desses cultivares não foram classificadas no laboratório quanto à sua origem genética. Os resultados que seguem, portanto, se referem às amostras indistintamente (quadro 3).

QUADRO 3 - Teores em α e β -caroteno e Impurezas em vários cultivares de tomate.

Amostra	β -caroteno mg%	α -caroteno mg% tracos	i_1^*
A	27	28	2
B	41	44	3
C	34	35	6
D	18	21	10
E	25	27	9
F	45	35	12
G	32	29	18
H	55	55	11
			15
			12
			2

$$*) i_1 = |E_{438}/E_{448} - 0,85| \%$$

A análise, quanto ao teor em α e β -caroteno, rendeu valores que permitem concluir:

- Os teores em β -caroteno variam por duas a três vezes entre amostras;
- Frutos da mesma amostra apresentam valores semelhantes entre si. Valor médio: $34,4 \pm 4,4$ mg%;
- Os possíveis teores de impurezas são relativamente baixos;
- O teor em α -caroteno é bem inferior ao de β -caroteno, sendo em vários casos nulo.

3.2. Licopeno

Em razão da natureza do material analisado, contávamos com quantidades apreciáveis de licopeno, e que, em geral, compunha a segunda fração do eluato.

3.2.1. Espectro de Licopeno

O eluato dessa fração era avermelhado. Seu espectro coinci-

diu, nas suas características, com o de licopeno autêntico. (figura 3).

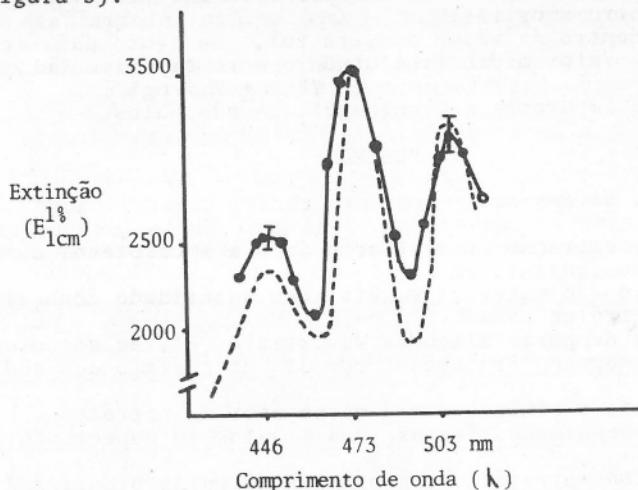


FIGURA 3 - Espectros de absorção de licopeno em éter de petróleo leve (---) e pesado (—).

3.2.2. Impurezas Contidas no Eluato do Licopeno

Entre as extinções dos três valores máximos do espectro, 446, 473 e 503 nm, existe definida proporção. Baseado nesta proporção estabelecemos dois critérios de pureza, q_1 e q_2 :
 $q_1 = E_{446}/E_{473}$; $q_2 = E_{503}/E_{473}$

3.2.3. Teor de Licopeno em Cultivares de Tomate

O material rendeu os teores em licopeno do quadro 4.

QUADRO 4 - Teores em licopeno e sua pureza em vários cultivares de tomate.

Amostra	Licopeno	q_1^*	q_2^{**}
mg %			
I	92	100	84
J	144	149	87
K	111	111	84
L	48	38	82
M	72	62	86
N	11	13	82

*) $q_1 = E_{446}/E_{473}$; valor médio de 40 determinações:
 $72,2 \pm 1,9\%$

**) $q_2 = E_{503}/E_{473}$; valor médio de 40 determinações:
 $85,0 \pm 1,9\%$

- Percebe-se pelos valores deste quadro, que:
- Há oscilações notáveis entre os teores em licopeno (mais de dez vezes entre amostras);
 - A variação dentro da mesma amostra foi, de fruto para fruto, pequena. Valor médio (incluindo o erro experimental): $78,9 \pm 7,7 \text{ mg\%}$
 - Os teores de impurezas são pequenos, se não nulos.

4. RESUMO

4.1. Técnica de Rotina

A técnica de extração e avaliação de α e β -caroteno, assim como de licopeno consiste em:

- * Liquidificação do material vegetal com quantidade conhecida de éter de petróleo pesado.
- * Cromatografia de parte alíquota do extrato etéreo em coluna de alumina, segundo Brockmann, com 3% de sulfato de sódio anidro.
- * Desenvolvimento e eluição com o mesmo éter de petróleo.
- * Leituras das densidades óticas dos eluatos em espectrofotômetro.
- * Cálculo das concentrações, conforme as fórmulas próprias desenvolvidas com material puro.

4.2. Observações Analíticas

- * O espectro de β -caroteno em éter de petróleo pesado difere em suas extinções dentro de 10% daquelas de β -caroteno em éter de petróleo leve.
- * Pela separação em alumina, aplicando-se éter de petróleo, conseguimos separar duas frações sem aumentar a polaridade:
a) α com β -caroteno;
b) Licopeno.
- * O critério estabelecido para avaliar α e β -caroteno permitiu observar também o teor de possíveis contaminações, 'impurezas'. Segundo os resultados, havia quantidades pequenas, se não nulas de impurezas.
- * A luz, nas condições de laboratório, causou uma destruição de 40% dentro de dois dias. Por outro lado o teor no escuro aparentemente aumenta, observação para a qual não temos explicação.
- * Em tomate, onde se conta com quantidade elevada de licopeno, foi obtida uma fração de eluato que prova ser, pelo espectro, licopeno notavelmente puro; impurezas só ocorreram em quantidades mínimas, se não nulas.

5. SUMMARY

The extraction and evaluation of α and β -carotene as well as licopene were performed by:

- * Homogenization of the samples in a blender with known amounts of petrol ether.
- * Chromatography in a column of alumina with 3% sodium sulfate suspended in petrol ether.
- * Elution with the petrol ether itself.
- * Optical density measurements at selected wavelengths.

- * Estimation of contents by formulas according to our working conditions.
- * Light as well as heavy petrol ether gave almost the same absorption spectrum of β-carotene.
- * By chromatography we could separate two main fractions:
 - a) α and β-carotene together in one fraction.
 - b) lycopene in the other fraction.
- * The spectrum of the carotene fraction permitted the evaluation of the concentration of both its solutes and the amounts of 'impurities'. Relying on our results there were only traces of impurities, if any, in this fraction.
- * Light conditions as usually found in our laboratory caused a decrease of 40% of carotene within two days.
- * On the other hand, samples of elutes when kept in the dark showed an increase of optical density not due to evaporation of the solvent.
- * In tomatoes the lycopene fraction showed a spectrum which revealed no impurities.

6. LITERATURA CITADA

1. ASOCIACIÓN DE QUÍMICOS DE VITAMINAS, INC. "Caroteno" Em *Métodos de Análisis de Vitaminas*. Leon, Espanha, Editorial Academia, 1969. p. 91-114.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analyses. 11. ed. Washington, 1970. 1015 p.
3. BEADLE, B.W. & ZSCHEILE, F.P. Studies on the Carotenoids. *J. Biol. Chem.*, 144:21-33. 1942.
4. CRAIG, R.G., BERGQUIST, L.M. & SEARCY, R.L.A New Vitamin A Color Reaction. *Anal. Biochem.*, 1(4/5): 433-436. 1960.
5. GOODWIN, T.W. "Carotenoids". Em: Paech, K. e Tracey, M.V. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Berlin, Springer Verlag, 1955. Vol. 3, p. 272-311.
6. HAWK, P.B., OSER, B.L. & SUMMERSON, W.H. *Practical Physiological chemistry*. 13. ed. New York, McGraw-Hill Comp. Inc., 1954. 1439 p.
7. JOSLYN, M.A. "Extraction Methods and Separation Processes". Em - *Methods in Food Analysis*. a. ed. New York. Acad. Press, 1970. p. 141-200.
8. LINSKENS, H.F. *Papierchromatographie in der Botanik*. Berlin, Springer Verlag, 1955. 253 p.
9. MAGALHÃES NETO, B.J.S. *Introdução ao Estudo dos Carotenoides do Caju*. Univ. Recife. Recife, 1952. 36 p. Tese Doc. Livre.
10. MOORE, T. *Vitamin A*. Amsterdam. Elsevier Publishing Company, 1957. 645 p.

11. MORTON, R.A. & ROSEN, D.G. Carotenoids, Vitamin A and 7-Dehydrosteroid in the Frog (*Rana temporaria*) Biochem. J. 45(5): 612-627. 1949.
12. STROHECKER, R. & HENNING, H.M. "β-Carotin". In: *Vitaminbestimmungen*. Darmstadt, Verlag Chemie GmbH, 1963. p. 62-67.
13. ZECHMEISTER, L. & CHOLNOKY, L. *Principles and Practice of chromatography*. London, Chapman e Hall Ltd., 1950. 361 p.