

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES PARA ESCALA DE MICRO-EXTRAÇÃO

⁽¹⁾Sidney Pacheco, ⁽¹⁾Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, ⁽¹⁾Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento, ⁽²⁾Carolina Passos da Cunha, ⁽¹⁾Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago e ⁽¹⁾Jeane Santos da Rosa

⁽¹⁾Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidney@ctaa.embrapa.br; ⁽²⁾Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ

Resumo – A demanda por resultados analíticos rápidos e confiáveis em um grande número de amostras gerada pelos projetos Biofort, AgroSalud e HarvestPlus aliado à exigência de métodos de extração e quantificação mais rápidos, econômicos e eficientes é crescente. O objetivo deste trabalho foi a comparação entre os métodos de extração convencional (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e um método proposto em escala de microextração. Foram utilizadas duas matrizes, cenoura e farinha de batata doce de polpa alaranjada. A determinação de carotenóides totais foi feita por espectrofotometria e a identificação dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência. A microextração de carotenóides mostrou-se mais eficiente que a convencional e economicamente mais viável, devido a redução de gastos com solventes e tempo de extração, ideal para laboratórios analíticos que utilizem a análise rotineiramente.

Palavras-chave: carotenoides, cromatografia líquida, microextração

Abstract – The demand for fast and reliable analytical results in a large number of samples generated by the projects BioFort, AgroSalud HarvestPlus and ally to the requirement of extraction methods and quantification faster, economical and efficient is increasing. The objective of this study was the comparison between the conventional extraction methods (Rodriguez-Amaya, 2001) and a proposed method in scale of microextraction. We used two arrays, carrot and sweet potato with orange pulp flour. Determination of total carotenoids was made by spectrophotometry and identification of carotenoids by high performance liquid chromatography. The microextraction of carotenoids was more efficient than conventional and more economically viable due to reduction of solvent extraction and time, ideal for analytical laboratories using routine analysis.

Keywords: liquid chromatography, beta-carotene

Introdução

Os carotenóides pertencem a uma família de mais de 600 pigmentos lipossolúveis abundantes na natureza (KRINSKY & JOHNSON, 2005). São de grande importância nutricional por serem precursores da vitamina A, cuja carência está associada à cegueira noturna, morte prematura de crianças e xerofthalmia. O interesse por estes pigmentos tem aumentado muito nos últimos anos devido à sua atividade antioxidante, reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares e formação de cataratas (KRINSKY, 1994; RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). A demanda por resultados analíticos rápidos e confiáveis em um grande número de amostras gerada pelos projetos Biofort, AgroSalud e HarvestPlus aliado à exigência de métodos de extração e quantificação mais rápidos, econômicos e eficientes é crescente. O objetivo deste trabalho foi a comparação entre os métodos de extração convencional (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e a

microextração. Foram utilizadas duas matrizes, cenoura e farinha de batata doce de polpa alaranjada. A determinação de carotenóides totais foi feita por espectrofotometria e a identificação dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência (PACHECO, 2009).

Material e métodos

Extração convencional

Foram pesados 0,5g de amostra para extração da farinha de batata doce de polpa alaranjada e 2g para extração da cenoura. As amostras foram então maceradas em graal de porcelana com 3g de celite e 50mL de acetona, a mistura foi filtrada a vácuo em funil de vidro com placa sinterizada. O procedimento foi repetido até que a matriz não apresentasse a coloração característica de carotenóides. O extrato cetônico foi transferido para funil de separação contendo 50mL de éter de petróleo. A mistura foi então lentamente lavada com 900mL de água ultrapura divididos em três lavagens. O extrato etéreo foi filtrado em sulfato de sódio anidro, recolhido em balão volumétrico de 100mL e avolumado com éter de petróleo. A absorvância da solução foi lida em Espectrofotômetro Shimadzu® Modelo UV-1800 para a determinação dos carotenóides totais. Para a obtenção do perfil cromatográfico e a quantificação de β -caroteno, α -caroteno e luteína, 1mL da solução etérea foi evaporado até a secura e o resíduo ressuspensionado com 100 μ L de acetona.

Microextração

Foram pesados 10mg de amostra para extração da farinha de batata doce de polpa alaranjada e 100mg para extração da cenoura. As amostras foram maceradas com bastão de vidro em tubo para microcentrífuga (eppendorf) de 2mL com 100mg de celite e 500 μ L de acetona. A mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante transferido para bureta de 25mL contendo de 5 a 10mL de solução 5% de éter etílico em éter de petróleo. A extração com acetona foi repetida até que a matriz não apresentasse a coloração característica de carotenóides. A mistura adicionada à bureta foi então lentamente lavada com 60mL de solução aquosa 5% de NaCl. O volume final do extrato etéreo foi obtido através de leitura na bureta e em seguida foi recolhido em vial de 3mL. Adicionou-se então 10mg de sulfato de sódio anidro ao extrato. A absorvância da solução foi lida em Espectrofotômetro Shimadzu® Modelo UV-1800 para o cálculo de carotenóides totais. Para a obtenção do perfil cromatográfico e a quantificação de β -caroteno, α -caroteno e luteína, 1mL da solução etérea foi evaporado até a secura e o resíduo ressuspensionado com 100 μ L de acetona.

Condições cromatográficas

Para a análise cromatográfica utilizou-se um cromatógrafo líquido modular Waters composto por bomba W600, degaseificador In-line, injetor automático 717plus e detector de arranjo de fotodiodos 996. A separação foi em coluna YMC C₃₀ Carotenoid (250 x 4,6mm x 3 μ m), a 33°C, com eluição em modo gradiente de éter metil terc-butilico em metanol, variando de 20 a 90% em 28 minutos com fluxo de 0,8mL/min e volume de injeção de 15 μ L (PACHECO, 2009).

Resultados e Discussão

As análises foram realizadas em triplicata utilizando o método convencional e o método da microextração. Os resultados foram submetidos ao Teste Grubbs para exclusão de valores aberrantes. Os resultados dos ensaios estão listados na Tabela 1:

Tabela 1. Teor de carotenóides ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em cenoura e farinha de batata doce de polpa alaranjada.

Matriz	Extração	β -caroteno	α -caroteno	Luteína	Totais	CV (%)
Cenoura	Microextração	11620	5162	246	17097	1,37
	Convencional	9764	4343	200	14395	0,98
Farinha de Batata Doce	Microextração	102739	8582	-	125090	3,48
	Convencional	91040	7227	-	108871	2,81

Verificou-se que os teores de carotenóides totais foram de 15 a 16% maiores nos resultados obtidos utilizando a microextração nas duas matrizes, portanto esta se apresentou mais eficiente que a convencional. O coeficiente de variação apresentado pelo método da microextração foi maior que o da convencional, porém esta diferença não é significativa e pode ser consequência da alíquota de amostra pesada ser menor para a microextração. O tempo requerido para a microextração foi de 30 minutos por extração e para a extração convencional foi de 50 minutos por extração, portanto houve uma redução 40% do tempo de análise e 92% em volume de solvente utilizado. O perfil cromatográfico manteve-se semelhante utilizando ambas extrações (Figura 1).

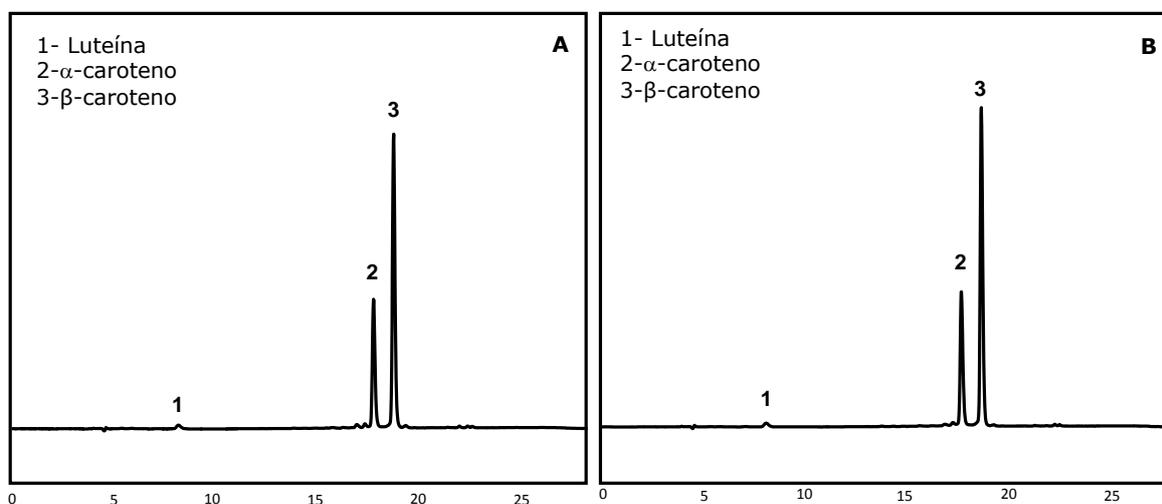


Figura 1 - Cromatograma de extrato de cenoura da extração convencional (A) e microextração (B).

Conclusão

A microextração de carotenóides mostrou-se mais eficiente que a convencional e economicamente mais viável, devido a redução de gastos com solventes e tempo de extração, ideal para laboratórios analíticos que utilizem a análise rotineiramente. No entanto ela exige pessoal mais habilitado e treinado para microanálise. São necessários ainda mais estudos com matrizes diversas e a validação da metodologia.

Referências

- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* v. 66, p. 1003-1010,1994.
- KRINSKY , N. I. & JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, p. 459-516, 2005.
- PACHECO, S. *Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida*. Seropédica, RJ, 2009. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- RIBEIRO, E.P. & SERAVALLI, E. A. G.. *Química de Alimentos*. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2004, p 155-157.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*, 2001. 64 p.