


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Paulo Roberto Nogueira Carvalho e aprovada pela comissão organizadora

17,09,90

  
-----  
Carol Hollingworth Collins

DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES PROVITAMINA A POR  
CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA E CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Aluno: Paulo Roberto Nogueira CARVALHO

Orientadora: Dra. Carol Hollingworth COLLINS

Dedico este trabalho à minha família que  
me possibilitou conquistar o melhor dos  
títulos: o de ser pai.

CÁSSIA REGINA LIMONTA CARVALHO

PRISCILA LIMONTA CARVALHO

ANDRÉ LIMONTA CARVALHO

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa e filhos pela compreensão, incentivo e carinho durante todo este trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo neste estudo.

Às Dras. Carol Hollingworth Collins e Délia Rodriguez-Amay pela orientação, paciência e amizade durante todo o curso.

À Marta Gomes da Silva e Clarice Ayaka Sigaki pelo grand auxílio durante toda a parte prática deste trabalho.

À todos os colegas da Seção de Glicídes pelo apoio e compreensão.

Ao ITAL pelo apoio e auxílio durante todo este trabalho.

À EMBRAPA pela bolsa oferecida durante o curso.

À todos aqueles que de uma maneira ou de outra participaram desta etapa de minha vida.

## ÍNDICE

PÁGINA

Resumo.....	1
Abstract.....	ii
1 - Introdução.....	1
2 - Revisão da literatura	
2.1 - Carotenóides próvitamina A.....	4
2.2 - Atividade vitamínica.....	12
2.3 - Métodos analíticos.....	15
2.3.1 - Cromatografia gás-líquido.....	16
2.3.2 - Cromatografia em papel.....	17
2.3.3 - Cromatografia em camada delgada.....	18
2.3.4 - Cromatografia em coluna aberta.....	18
2.3.4.1 - Método recomendado pela AOAC.....	20
2.3.4.2 - Método recomendado pela COST, 91.....	20
2.3.4.3 - Separação individual dos carotenóides.....	22
2.3.4.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência.....	24
3 - Materiais e métodos.	
3.1 - Matéria prima.....	26
3.2 - Equipamento.....	26
3.3 - Vidrarias.....	27
3.4 - Reagentes.....	27
3.5 - Métodos de separação e quantificação.....	28
3.5.1 - Método espectrofotométrico com separação por cromatografia em coluna aberta.....	28

3.5.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
3.6 - Reações químicas utilizadas na confirmação da identidade dos carotenóides provitamina A.....	33
3.6.1 - Presença de grupos 5,6-epóxidos.....	33
3.6.2 - Confirmação da configuração cis-trans.....	34
3.6.3 - Presença de grupos hidroxilas.....	34
3.7 - Cálculo do valor de vitamina A.....	35
4 - Resultados e discussão.	
4.1 - Extração dos pigmentos.....	36
4.2 - Separação dos pigmentos.....	36
4.2.1 - Cromatografia em coluna aberta.....	36
4.2.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência.....	39
4.3 - Identificação dos carotenóides provitamina A.....	40
4.4 - Quantificação dos carotenóides provitamina A.....	45
4.5 - Recuperações analíticas.....	55
4.6 - Determinação de provitamina A em algumas amostras reais.....	56
4.7 - Avaliação das técnicas de CCA e CLAE na análise de carotenóides provitamina A.....	57
5 - Conclusão.....	64
6 - Referências bibliográficas.....	65

## ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 - Nomes comuns e estruturais de alguns carotenóides citados neste estudo.....	7
Tabela 2 - Atividade vitamínica de alguns carotenóides.....	10
Tabela 3 - Biopotência de isômeros de carotenóides segundo alguns autores.....	11
Tabela 4 - Doses diárias de vitamina A recomendadas.....	14
Tabela 5 - Resultados do estudo de recuperações analíticas para as técnicas de CCA e CLAE.....	56
Tabela 6 - Resultados analíticos das amostras estudadas obtidos a partir de CCA e CLAE com padronização interna e externa (Sudan I).....	58
Tabela 7 - Valores observados (BTN) para as técnicas de CCA e CLAE nas análises de carotenóides provitamina A em alimentos.....	62
Tabela 8 - Comparação de custos entre CCA e CLAE na análise de carotenóides próvitamina A em alimentos.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 - Biossíntese de carotenóides.....	5
Figura 2 - Fórmulas estruturais de alguns carotenóides citados neste estudo.....	8
Figura 3 - Fórmulas estruturais do licopeno e do $\beta$ -caroteno...	9
Figura 4 - Fluxograma do estudo de carotenóides provitamina A	31
Figura 5 - Cromatogramas (CLAE) com detecção a 470nm e espectro de absorção obtidos de frações de uma amostra de cenoura separada por CCA.....	38
Figura 6 - Cromatogramas (CLAE) obtidos a partir de uma amostra de cenoura ( $\alpha$ e $\beta$ -caroteno) usando comprimentos de ondas de 470, 450, 445, 440 e 436 nm.....	41
Figura 7 - Cromatogramas (CLAE) e espectros de absorção de uma solução de trans- $\beta$ -caroteno, antes e depois de isomerização química.....	42
Figura 8 - Separação de estereoisômeros de $\beta$ -caroteno em CCA ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e CLAE (C-18).....	44
Figura 9 - Cromatogramas (CLAE) de um extrato de mamão antes e depois de reação com HCl.....	46
Figura 10 - Fórmula estrutural e espectro de absorção de Sudan I (1-(fenilazo) 2-naftalenol) em metanol.....	48
Figura 11 - Cromatogramas (CLAE) de Sudan I, extrato de couve antes e após a separação em micro coluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1).....	50
Figura 12 - Cromatogramas (CLAE) de uma amostra de tomate antes e após a separação em micro coluna de óxido de	

	magnésio e Hyflosupercel (1:1).....	51
Figura 13 -	Curva de calibração para $\beta$ -caroteno, utilizando Sudan I como padrão interno.....	52
Figura 14 -	Curva de calibração para $\alpha$ -caroteno, utilizando Sudan I como padrão interno.....	53
Figura 15 -	Curva de calibração para $\beta$ -criptoxantina, utilizando Sudan I como padrão interno.....	54
Figura 16 -	Separação de $\alpha$ e $\beta$ -caroteno em CCA, espectros de absorção e cromatogramas (CLAE) das frações separadas a partir de um extrato de azeite de dendê.....	59



Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas

DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES PROVITAMINA A POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA (CCA) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

Aluno: Paulo Roberto Nogueira CARVALHO

Orientadora: Carol Hollingworth COLLINS

### RESUMO

Neste trabalho estudou-se a determinação de carotenóides provitamina A em alguns alimentos através do uso de cromatografia em coluna aberta (CCA) com óxido de magnésio e Hyflosupercel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna com fase reversa (C-18). A quantificação em CLAE foi obtida pelo uso de padrão externo ou de padrão interno com Sudan I. Os resultados obtidos com  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno em cenoura e azeite de dendê,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina em mamão e  $\beta$ -caroteno em tomate e couve foram bons, mostrando que qualquer uma das três técnicas podem ser usadas, desde que as análises sejam conduzidas sob ótimas condições. Uma boa separação das diferentes próvitaminas em CCA depende da experiência do analista e da sua acuidade visual. A quantificação com padrão externo em CLAE requer injeção frequente de padrões analíticos, fazendo com que a variação da pureza dos padrões comerciais e a alta instabilidade destes compostos seja um grave problema. A estabilidade do Sudan I faz com que a quantificação com padrão interno em CLAE apresente-se

como o método preferido. Para isso entretanto foi necessário clarificar o extrato, passando-o através de uma minicoluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel, antes da injeção, para a separação de clorofila e dihidroxi e trihidroxi carotenóides que, de outro modo, eluem com o Sudan I. A diferença de estrutura do Sudan I e das próvitaminas não afetou os resultados quantitativos. A separação cromatográfica e a identificação das provitaminas pode ser mais facilmente estabelecidas pelo uso de CLAE com padrão interno, complementada com CCA.

Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas

PROVITAMIN A CAROTENOID DETERMINATION BY OPEN COLUMN CHROMATOGRAPHY (OCC) AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC).

Student: Paulo Roberto Nogueira CARVALHO

Supervisor: Carol Hollingworth COLLINS

ABSTRACT

The provitamin content of some food samples was determined by methods involving chromatography on a MgO : Hyflosupercel open column (OCC) and reversed phase high performance liquid chromatography, the quantitation being done by external standardization (HPLC-ES) or internal standardization (HPLC-IS) with Sudan. The results obtained with  $\alpha$  - and  $\beta$  -carotene in carrots and Dende oil,  $\beta$  -carotene and  $\beta$  -criptoxanthin in papaya and  $\beta$  -carotene in tomato and kale agreed well, showing that any one of the three techniques can be used, provided the analysis is done under optimum conditions. Good separation of the different provitamins in OCC depended on the analyst's skill and visual acuity. HPLC-ES required a constant supply of provitamin standards; thus the varying purity of commercially available standards and the high instability of these compounds posed grave problems. Due the stability of Sudan, HPLC-IS appeared to be the method of choice although passage of the extract through a MgO : Hyflosupercel minicolumn was needed prior to injection to separate chlorophylls and dihydroxy and trihydroxycarotenoids which

would otherwise elute with Sudan. Nonconformity of the Sudan structure to those of the provitamins did not affect the quantitative results.

The chromatographic separation and identity of the provitamins could be more easily established by using HPLC-IS, complemented with OCC.

## 1- INTRODUÇÃO.

Os carotenóides, que compreendem a maior classe de pigmentos de ocorrência natural, tem sido objetos de inúmeros estudos desde que, em 1831, WACKENRODER isolou um pigmento da cenoura, para o qual deu o nome de caroteno (de carrot root)(ROBERTS, 1981). Em 1919, STEENBOCK descobriu que existe uma relação entre os carotenóides e a vitamina A e em 1930 MOORE estabeleceu que alguns carotenóides podem se transformar em vitamina A no organismo animal (FERREIRA, 1983).

Atualmente os carotenóides presentes na alimentação de origem vegetal participam com 68% da vitamina A fornecida na dieta da população mundial, sendo que em países em desenvolvimento estes valores ultrapassam a 80% (SIMPSON, 1983). Tendo em vista que a deficiência de vitamina A é um dos mais graves problemas de saúde pública nestes países, podemos explicar a importância que apresentam trabalhos nesta área.

O interessado encontra hoje um grande número de tabelas que apresentam o teor de vitamina A em alimentos de origem vegetal, obtidos a partir da análise da composição de carotenóides. Todavia, nota-se uma grande divergência nestes valores em um mesmo alimento entre as diferentes tabelas, o que dificilmente pode ser explicado como resultados da diferença de variedades, solo, clima, etc.

Tudo isto faz com que se discuta uma reavaliação destes valores, gerando inúmeros trabalhos que, com algumas exceções, persistem em erros analíticos, aumentando o número de resultados pouco confiáveis.

Tendo em vista que são poucos os carotenóides que podem atuar como precursores de vitamina A e os que podem apresentar atividades vitamínicas diferentes, há a necessidade de que os métodos analíticos apresentem a propriedade de remover os carotenóides inativos e quantificar individualmente as diversas formas de carotenóides provitamina A, além do que, em virtude de suas moléculas altamente insaturadas, deve-se evitar mecanismo que promovam isomerização e oxidação durante as análises.

Os métodos clássicos de determinação de provitaminas A são: o método da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) que se baseia na extração dos carotenóides, clarificação e cromatografia em coluna com óxido de magnésio, e o método recomendado pela COST (European Cooperation in Scientific and Technological Research), que diferencia os procedimentos de extração e clarificação de acordo com a amostra analisada e realiza a separação dos carotenóides por cromatografia em coluna com alumina desativada.

Todavia, observa-se que apesar do uso da cromatografia em coluna aberta em ambos os métodos, não são realizadas as separações das provitaminas individualmente, e a quantificação geralmente é realizada como  $\beta$ -caroteno, mesmo com a presença de outros possíveis carotenóides.

Estudos comparando ambos os métodos com o método de determinação individual dos carotenóides indicam que eles são inadequados para a determinação de próvitamina A, superestimando várias vezes o valor vitamínico das amostras.

Portanto ganha força o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na determinação de carotenóides provitamina A, que é descrita como mais veloz, simples, exata e reprodutiva que as técnicas acima mencionadas. Todavia observa-se que os passos anteriores à injeção cromatográfica são geralmente longos e trabalhosos, dificultando seu emprego nesta área analítica.

O presente trabalho procurou estudar os procedimentos analíticos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia em coluna aberta na determinação de carotenóides provitamina A em alguns alimentos, procurando soluções mais rápidas que agilizem os processos pré-cromatográficos e a quantificação.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA.

### 2.1 - Carotenóides provitamina A.

Os carotenóides podem ser considerados o maior e mais importante grupo de pigmentos naturais. São encontrados em fungos, bactérias, animais e em todos os tecidos de plantas verdes e tecidos não fotossintéticos como: frutas, flores, sementes e raízes. (SIMPSON e CHICHESTER, 1981).

São na sua maioria tetraterpenos, formados por oito unidades de isopreno, unidas através de ligação cabeça-cauda (exceto no centro da molécula) com estrutura simétrica e reversão do plano de simetria no centro da molécula. Sua característica cromófora é dada por uma série de duplas ligações conjugadas.

A biossíntese dos carotenóides se inicia no acetato, que através de sucessivas reações forma o fitoeno, que é a estrutura básica dos carotenóides acíclicos com 40 átomos de carbono.

O momento da ciclização dos carotenóides e da introdução de grupos hidroxilas ainda não está bem estabelecido. Grupos de pesquisadores como o de GOODWIN (1980) e o de CHICHESTER e McFEETERS (1971) acreditam que a formação de carotenos cíclicos e oxicarotenóides passa pela formação de zeacaroteno, enquanto que ANDERSON e PORTER (1962) acreditam que a ciclização ocorre a partir do licopeno, Figura 1. Todavia, recentemente, BRITTON (1988) sugeriu que está sendo dada excessiva importância a esta questão e que a reação de ciclização pode ser a mesma para ambos os casos. Sua afirmação está baseada na observação que o processo de



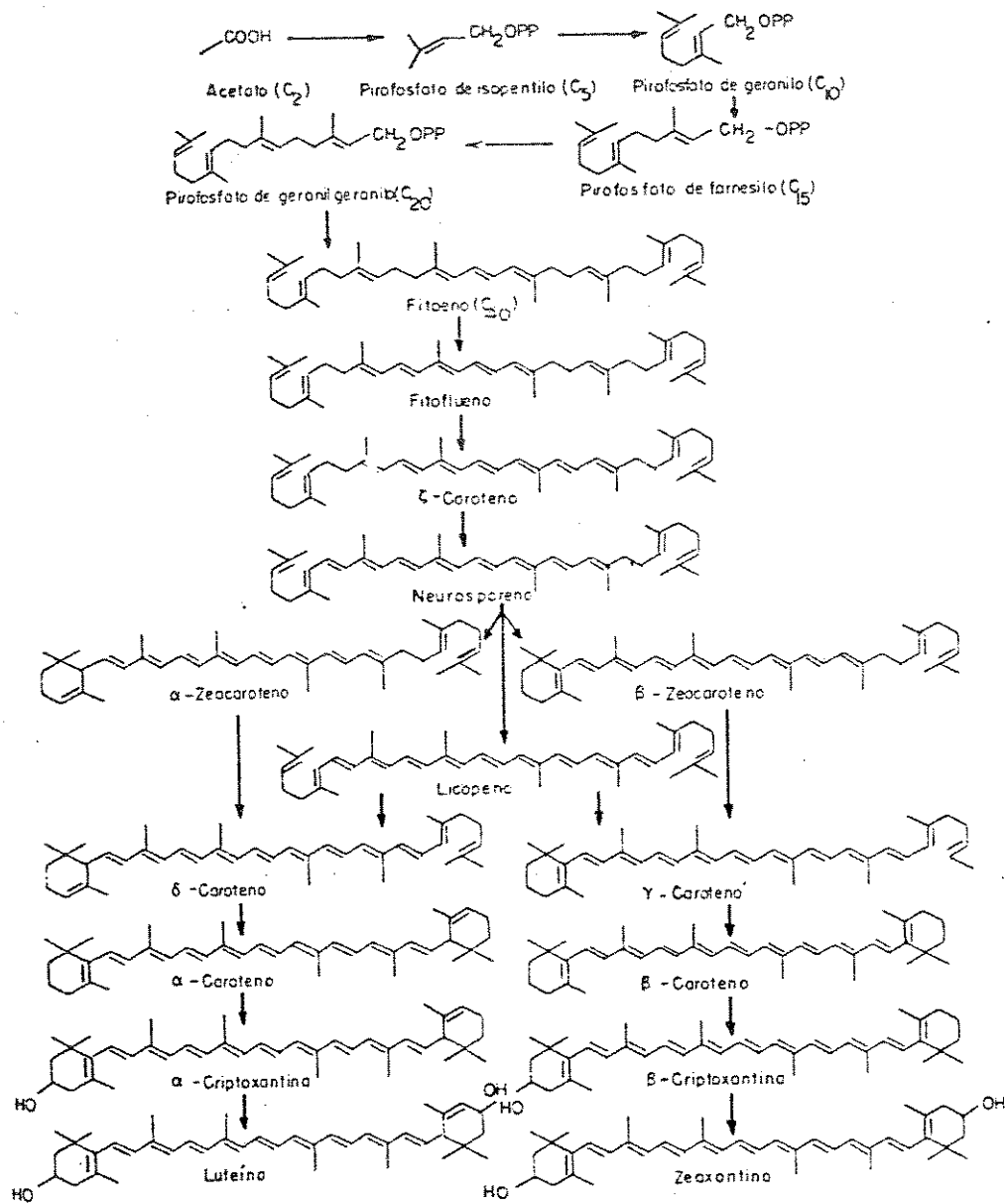


Figura 1. Biosíntese de carotenóides

ciclização requer simplesmente que um dos grupos finais da molécula do carotenóide tenha alcançado o nível de saturação do licopeno.

Os carotenóides são naturalmente encontrados nos tecidos celulares em meio protoplasmático, na forma livre ou formando complexos com proteínas. Em frutas encontram-se ligados a proteínas ou formando dispersões físicas muito finas em meio aquoso. Nos animais os carotenóides estão presentes na forma de gotículas coloridas (RITTER e PURCELL, 1981).

A nomenclatura dos carotenóides é complicada pelo grande número de nomes triviais dados a eles durante suas descobertas. Assim a Commission on Biochemical Nomenclature (IUPAC-IUB, 1971) recomenda que os nomes triviais dos carotenóides sejam acompanhados pelos correspondentes nomes sistemáticos. Na Tabela 1 são dados os nomes comuns e sistemáticos dos principais carotenóides citados neste estudo e suas estruturas são apresentadas na Figura 2.

Quimicamente os carotenóides podem ser classificados como acíclico, monocíclico e bicíclico, usando o licopeno como modelo básico (BAUERNFEIND, 1972). Portanto pode-se obter as estruturas dos outros carotenóides introduzindo mudanças nas extremidades da molécula do licopeno. Deste modo WEEDON (1971) define o  $\beta$ -caroteno como um "licopeno bicíclico" (Figura 3).

Tabela 1. Nomes comuns e estruturais de alguns carotenóides citados neste estudo.

nome comum	nome estrutural
$\beta$ -caroteno	$\beta$ , $\beta$ -caroteno
$\alpha$ -caroteno	(6'R)- $\beta$ , $\epsilon$ -caroteno
$\beta$ -criptoxantina	(3R)- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-3-ol
$\beta$ -apo-8' -carotenal	8' -apo- $\beta$ -caroteno-8' -al
canthaxantina	$\beta$ , $\beta$ -caroteno-4, 4' -dione
$\zeta$ -caroteno	7,8,7',8' -terahidro- $\psi$ , $\psi$ -caroteno
licopeno	$\psi$ , $\psi$ -caroteno
$\beta$ -zeacaroteno	7' ,8' -dihidro- $\beta$ - $\psi$ -caroteno

BAUERNFEIND classifica também os carotenóides segundo seus componentes e grupos funcionais como carotenos ou carotenóides hidrocarbonetos e oxicarotenóides.

Atualmente, mais de 500 estruturas de carotenóides já foram elucidadas, todavia observa-se que apenas alguns podem ser convertidos em vitamina A. OLSON e LAKSHMANAN (1970) citaram 19 e BAUERNFEIND 32 carotenóides capazes desta conversão.

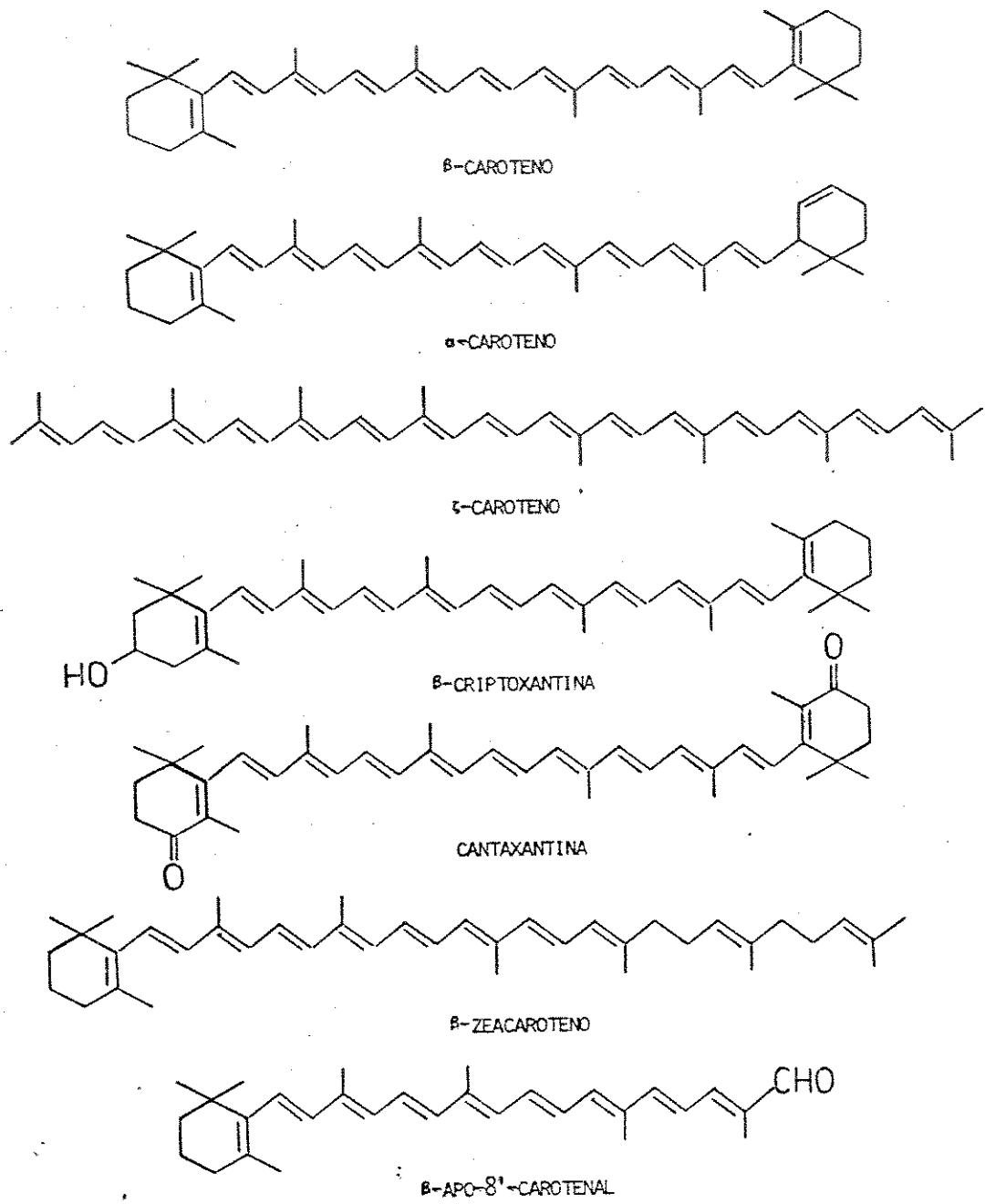


Figura 2. Fórmulas estruturais de alguns carotenóides citados neste estudo.

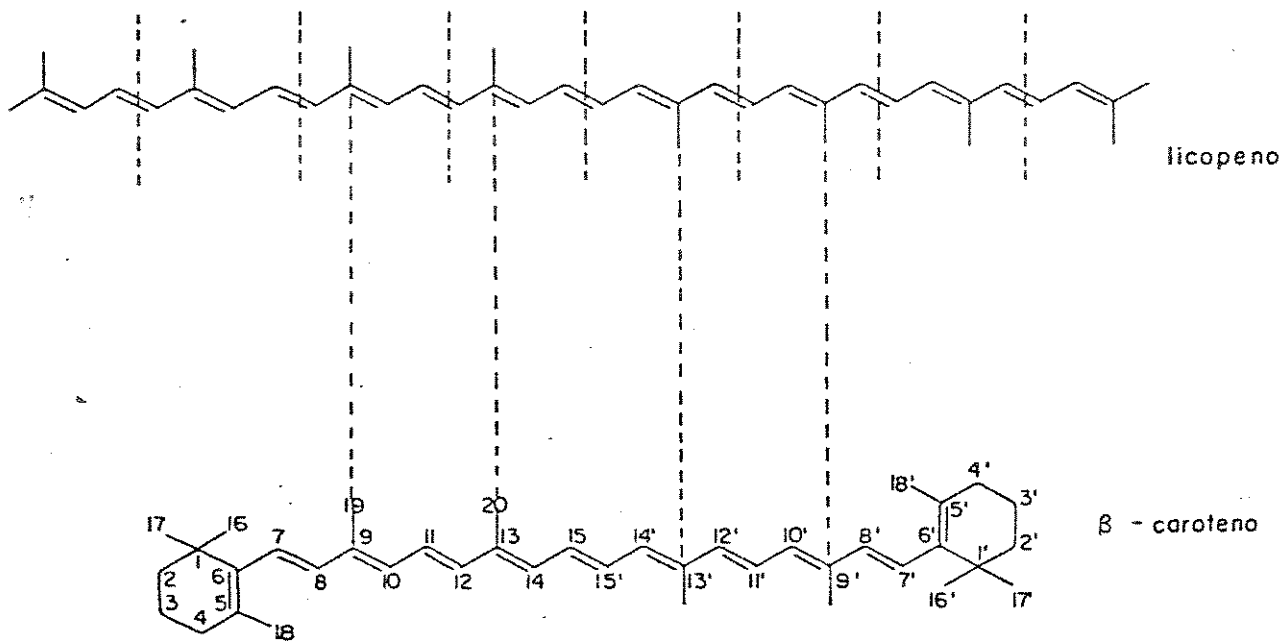


Figura 3. Fórmulas estruturais do licopeno e do  $\beta$ -caroteno.

Um carotenóide só apresenta atividade vitamínica quando possui em sua molécula um anel de  $\beta$ -ionona não substituído e com cadeia lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos. Na Figura 2 são apresentadas as fórmulas estruturais de alguns carotenóides, onde o  $\beta$ -caroteno, que possui dois anéis de  $\beta$ -ionona ligados por uma cadeia poliênica de 22 carbonos, possui uma atividade vitamínica igual a 100%. A  $\beta$ -criptoxantina, que apresenta um grupo hidroxila em um dos anéis  $\beta$ -ionona apresenta apenas 50% de atividade, assim como o  $\gamma$ -caroteno que possui apenas um anel  $\beta$ -ionona e o  $\alpha$ -caroteno que possui um dos anéis  $\alpha$ -ionona.

Alguns destes carotenóides e sua atividades vitamínicas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade vitamínica A de alguns carotenóides.

Carotenóide	Atividade (%)
$\beta$ -caroteno	100
$\alpha$ -caroteno	52 - 54
$\gamma$ -caroteno	42 - 50
$\beta$ -Criptoxantina	50 - 60
$\beta$ -zeacaroteno	20 - 40
$\beta$ -apo-8'-carotenal	36 - 72

Referência: BAUERNFEIND (1972).

Os isômeros cis dos carotenóides provitamina A apresentam uma menor atividade que suas formas trans. Vários estudos mediram a ação provitamínica dos isômeros de carotenos ativos, utilizando para isso vários critérios. DEUEL et al (1944 e 1945) verificaram a ação no crescimento de cobáias, JOHNSON e BAUMAN (1947) e SWEENEY e MARSH (1973) estudaram o armazenamento no fígado de cobáias. A Tabela 3 mostra os resultados encontrados pelos diversos autores para alguns isômeros.

Tabela 3. Biopotência de isômeros de carotenóides segundo alguns autores.

Isômero	Biopotência (%)		
	DEUEL et al. (1945)	JOHNSON e BAUMANN (1947)	SWEENEY e MARSH (1973)
Trans- $\beta$ -caroteno	100	100	100
Neo- $\beta$ -caroteno B	53	48	74
Neo- $\beta$ -caroteno U	38	33	61
Trans- $\alpha$ -caroteno	53	25	37
Neo- $\alpha$ -caroteno B	16		22
Neo- $\alpha$ -caroteno U	13		23

## 2.2 - Atividade vitamínica.

O termo "atividade vitamínica A" é usado para compostos que exibem a atividade biológica do retinol. Nos mamíferos esta atividade é propiciada pelos ésteres do retinol que quando atingem o lúmen do intestino delgado sofrem hidrólise. O retinol resultante penetra no interior da célula onde é reesterificado e transportado para os rins, músculos e principalmente para o fígado. Do fígado o retinol é mobilizado para atender as necessidades dos tecidos.

O retinol participa da formação da púrpura visual (rodopsina), que é o receptor da luz para a visão na semiobscuridade. Quando a luz atinge a retina ocorre a isomerização da dupla ligação delta 11-cis e a rodopsina se desintegra em seus componentes: opsina (uma proteína) e trans-retinal.

A opsina, ao combinar-se com o aldeído de neo-B-vitamina A (cis-retinol), regenera a rodopsina, renovando assim a sensibilidade à luz. Nos processos de desintegração da rodopsina e isomerização do retinol há liberação de energia, que ativa o nervo óptico e resulta na excitação que propicia a visão.

Portanto o termo vitamina A refere-se a compostos pré formados, como retinol, retinal, ácido retinóico e outros derivados de alimentos de origem animal como o leite, a carne, etc. Os alimentos de origem vegetal fornecem a provitamina A, que são os carotenóides que podem ser biologicamente transformados em vitamina A.



A conversão dos carotenóides em vitamina A ainda é mal conhecida, contudo sabe-se que a transformação se realiza no intestino delgado, através de dois possíveis caminhos: a clivagem no centro da molécula ou a desintegração escalonada da provitamina a partir de um dos lados da molécula. Este segundo caminho é baseado na presença natural de  $\beta$ -apo-8'-carotenal, que seria um intermediário desta transformação, e pelos índices de transformação do  $\beta$ -caroteno em vitamina A. O primeiro caminho é fortalecido pelo isolamento, desde o intestino de várias espécies, da enzima  $\beta$ -carotenóide-15, 15'-dioxigenase, que apresenta a propriedade de converter uma molécula de  $\beta$ -caroteno em duas moléculas de retinal (OLSON, 1989).

A atividade vitamínica foi originalmente expressa em unidades internacionais (UI), que é definida como a dose requerida para produzir um ganho de peso de 3 g/semana em cobaias jovens entre a quarta e a oitava semana de vida. O Expert Committee on Biological Standardization da Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu que uma unidade internacional equivale a exatamente 0,3  $\mu$ g de retinol cristalino ou a 0,344  $\mu$ g de acetato de retinila ou a 0,55  $\mu$ g de palmitato de retinila ou a 0,6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno (BAUERNFEIND, 1972).

As necessidades vitamínicas de um indivíduo devem ser fixadas com certas reservas pois devem adaptar-se à exigência do metabolismo. Na falta de um acordo internacional sobre a ingestão diária recomendada, uma das mais aceitas é a tabela elaborada pela Comissão de Alimentação e Nutrição do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos e apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Doses diárias de vitamina A recomendadas.

	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)	Vitamina A (UI)
Infantes	0,0 - 0,5	6	60	1400
	0,5 - 1,0	9	71	2000
Crianças	1 - 3	13	90	2000
	4 - 6	20	112	2500
	7 - 10	28	132	3300
Homens	11 - 14	45	157	5000
	15 - 18	66	176	5000
	19 - 22	70	177	5000
	23 - 50	70	178	5000
	51+	70	178	5000
Mulheres	11 - 14	46	157	4000
	15 - 18	55	163	4000
	19 - 22	55	163	4000
	23 - 50	55	163	4000
	51+	55	163	4000
Grávidas				+1000
Lactantes				+2000

Referência: NAS-NRC (1980).

Além das funções no organismo humano e de outros animais como provitamina A e como protetores de certas ações nocivas, como prevenção de câncer (MATHEUS-ROTH, 1985 e COLDITZ et al, 1985), os carotenóides ainda apresentam a propriedade de conferir cor aos alimentos, através da adição direta em doces, produtos de panificação, margarina, queijos, salsichas e outros.

### 2.3 - Métodos Analíticos.

Na quantificação de carotenóides provitamina A têm sido empregados vários procedimentos analíticos que vão desde ensaios biológicos a modernas técnicas espectrofotométricas.

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), uma metodologia para determinar satisfatoriamente o conteúdo de provitamina A de um alimento deve obedecer os seguintes requisitos: (1) os carotenóides inativos devem ser separados e removidos; (2) as provitaminas A devem ser separadas e quantificadas individualmente; (3) para cada provitamina A as formas cis e trans devem ser quantificadas separadamente e (4) deve-se procurar evitar a formação artificial de isômeros e a diminuição quantitativa durante a análise.

Os passos analíticos mais comuns na determinação destes nutrientes são: extração, saponificação, separação dos pigmentos e quantificação.

Os procedimentos de extração dependem diretamente da amostra analisada e foram revisados em detalhes por DAVIES

(1976). Geralmente tem sido empregados solventes orgânicos como a acetona e o metanol, em operações sucessivas até a retirada quantitativa do pigmento, com ou sem a trituração prévia da amostra.

Com a extração completa, as impurezas coextraídas, como os lípides polares, são removidos através da partição com água ou soluções salinas.

O passo seguinte, geralmente, é a saponificação da amostra, justificada pela necessidade de se remover lípidos que possam interferir na análise. A saponificação é realizada a quente por 5 a 10 minutos ou por exposição prolongada (12 horas), à temperatura ambiente, do extrato a uma solução metanólica de NaOH ou KOH em concentrações que variam de 2 a 10% (TAYLOR, 1983).

Finalmente, após todo o álcali ser removido por lavagem sucessivas com água, o extrato é concentrado e os pigmentos são separados, por técnicas cromatográficas, e quantificados.

### 2.3.1 - Cromatografia gás-líquido.

A maior dificuldade para a determinação de carotenóides por cromatografia gás-líquida é a termolabilidade da cadeia poliênica, todavia observa-se o uso desta técnica em vários trabalhos, principalmente em combinação com espectrometria de massas para facilitar as identificações. (TAYLOR, 1983).

Os carotenóides não podem ser analisados diretamente por cromatografia gás-líquido, sendo necessária uma prévia hidro-

genação da cadeia poliênica, que geralmente é realizada com gás hidrogênio catalisada com dióxido de platina. As xantofilas que contêm grupos hidroxilas devem ser aciladas ou silanizadas previamente (LAMBERT et al., 1985).

As fases estacionárias líquidas utilizadas apresentam características apolares ou moderadamente polar e os suportes utilizados devem ser silanizados para bloquear possíveis grupos superficiais polares.

TAYLOR (1983) apresenta em sua revisão uma série de fases estacionárias e condições cromatográficas para estas determinações.

### 2.3.2 - Cromatografia em papel.

A cromatografia em papel foi bastante utilizada na análise de carotenóides, todavia estes pigmentos estão sujeitos à degradação e isomerização durante este tipo de separação, tornando difícil a identificação positiva de um carotenóide desconhecido.

Em suas revisões sobre cromatografia de carotenóides, TAYLOR (1983) e SISTAK (1980) descrevem uma série de papéis e sistemas de solventes para estas separações.

### 2.3.3 - Cromatografia em camada delgada.

A cromatografia em camada delgada é particularmente útil como um método analítico de acompanhamento de reações de carotenóides.

Na cromatografia em camada delgada, como na maioria das separações cromatográficas de carotenóides, a identificação depende de padrões analíticos realmente puros e de confirmação por sistemas diferentes. Segundo TAYLOR (1983), qualquer trabalho de identificação de carotenóides baseados no uso de padrões analíticos, usando somente cromatografia em camada delgada, deve ser visto com cuidado. Ele recomenda o uso de outro método de identificação.

A quantificação pode ser obtida pelo uso de densitômetro ou pela remoção das manchas, extração e leitura espectrofotométrica (SIMPSON et al, 1985).

Segundo LAMBERT et al (1985), os materiais mais usados como fase estacionária em cromatografia em camada delgada são óxido de magnésio e Hyflosupercel. Além desses, TAYLOR (1983) apresenta uma tabela contendo tipos de fases estacionárias, sistemas de solventes e exemplos de aplicações na análise de carotenóides.

### 2.3.4 - Cromatografia em coluna aberta (CCA).

A cromatografia em coluna aberta ou cromatografia em coluna clássica é, sem dúvida, o método mais usado na determina-

ção de carotenóides provitamina A.

Uma numerosa combinação de suportes e solventes é encontrada nas revisões de DAVIES (1976), TAYLOR (1983) e SIMPSON et al. (1985).

As fases estacionárias usadas vão desde recheios apolares a altamente polares como sílica gel e alumina ativada. Todavia o uso de sílica gel na separação de carotenóides pode causar degradação e isomerização (STRAIN et al., 1967; RODRIGUEZ et al., 1976a; TANAKA et al., 1981 e TAYLOR, 1983).

Os isômeros cis e trans dos carotenóides provitamina A são geralmente separados em colunas de hidróxido de magnésio, utilizando para isto frações de carotenóides pré separadas (BICKOFF et al., 1949; SWEENEY e MARSH, 1970 e 1971ab; GEBHARDT et al., 1977; OGUNLESI e LEE, 1979; EDWARDS e LEE, 1986; LEE et al., 1981 e 1984 e LEE, 1986).

Muitas combinações de solventes tem sido usadas na eluição destes pigmentos, onde a mais comum é a combinação de éter de petróleo (30 - 60°C) ou hexano com concentrações crescentes de éter etílico, acetona ou benzeno.

Dos vários métodos que utiliza a cromatografia em coluna aberta para a análise de carotenóides, três métodos podem ser considerados os mais usados: o método recomendado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984); o método recomendado por COST, 91 (Cooperation Europeenne dans le domaine de la recherche Scientifique et Technique - BRUBACHER et al., 1986) e a separação individual dos carotenóides (RODRIGUEZ et al., 1976 b).

#### 2.3.4.1 - Método recomendado pela AOAC.

Este método tem sido bastante criticado, principalmente por assumir que todo o pigmento obtido é  $\beta$ -caroteno. Segundo RODRIGUEZ-AMAYA et al (1988), este método pode superestimar os valores de vitamina A de alguns alimentos, por conter as provitaminas menos ativas como o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\gamma$ -caroteno, bem como carotenóides inativos como  $\zeta$ -caroteno,  $\alpha$ -zeacaroteno, etc. Além disso, o uso de uma quantidade predeterminada de solventes na extração pode ocasionar a extração incompleta dos pigmentos. A leitura da solução a 436 nm, que não é o comprimento de absorbância máxima do  $\beta$ -caroteno, pode também induzir a erros (SIMPSON, 1983).

O método da AOAC consiste basicamente de uma extração com uma mistura de acetona, hexano, etanol e tolueno (7:10:6:7), saponificação a frio por 16 horas, filtração, remoção da acetona com água e cromatografia em coluna de óxido de magnésio e terra diatomácea (1:1), com acetona : hexano (4:96) como eluente. A absorbância da solução é obtida a 436 nm e o resultado é expresso como  $\beta$ -caroteno.

#### 2.3.4.2 - Método recomendado pela COST, 91.

O método recomendado pela COST, 91 (BRUBACHER et al, 1986) indica três diferentes procedimentos para a análise de carotenóides provitamina A, dependendo do material analisado: (a)



determinação de carotenóides totais em alimentos complexos; (b) determinação de carotenos naturais totais em frutas, vegetais e materiais de plantas inalterados e (c) determinação de carotenos totais em bebidas.

No procedimento (a), a amostra é saponificada com uma solução de etanol, hidróxido de potássio, éter de petróleo (30 - 60°C) e hidroquinona por 30 minutos a 60° C. Os pigmentos são então extraídos com éter etílico. Uma alíquota da fase etérea é lavada com água para a remoção do álcali, concentrada e submetida a cromatografia.

No procedimento (b), o material seco de plantas é deixado em repouso por uma noite com uma mistura de hexano e acetona e saponificado por 30 minutos à temperatura ambiente, com uma solução metanólica de hidróxido de potássio. Após a adição de água, a fase hexânica é separada e uma alíquota é concentrada para a cromatografia.

Os materiais de plantas frescas são extraídos com acetona e saponificados com uma solução metanólica de hidróxido de potássio por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a adição de hexano, a acetona e o hidróxido de potássio são removidos por lavagem com água e a fase hexânica é concentrada para a cromatografia.

No procedimento (c), os pigmentos são extraídos com clorofórmio, através de agitação, a emulsão é centrifugada e a fase aquosa é removida. O extrato é então filtrado e uma alíquota é concentrada para a cromatografia.

Em todos os procedimentos os concentrados são retomados em hexano e aplicados em uma coluna cromatográfica contendo alumina 90, atividade I (Merck), desativada (100 g de alumina + 12 ml de água). Os pigmentos são eluídos com hexano e a absorbância é medida a 450 nm. O resultado é calculado como  $\beta$ -caroteno.

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), este método, além de poder ser simplificado em alguns passos, como a substituição das evaporações sucessivas para a remoção de água pela adição de sulfato de sódio anidro, superestima o valor de vitamina A em amostras que tenham alto teor de  $\alpha$ -caroteno, como as abóboras, e subestima este valor em amostras que apresentam altos teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -criptoxantina, como mamão.

#### 2.3.4.3 - Separação individual dos carotenóides.

Embora os métodos da AOAC e COST utilizem cromatografia em coluna, eles não separam as provitaminas A individualmente, o que, na maioria dos casos, é a maior fonte de erros.

A determinação individual dos carotenóides em alimentos tem sido bastante estudada (RODRIGUEZ et al., 1976a; CECCHI e RODRIGUEZ-AMAYA, 1981a,b; PADULA et al., 1983; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1983; PADULA e RODRIGUEZ-AMAYA, 1986 e 1987; GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA, 1987 e 1989; ARIMA, 1987; ARIMA e RODRIGUEZ-AMAYA, 1988) e, através destes valores, pode ser obtido o valor vitamínico A, considerando os carotenóides ativos.

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), quando utilizado somente para a determinação do valor vitamínico, o método de separação individual dos carotenóides pode ser bastante simplificado, uma vez que somente os carotenóides provitamina A são identificados e quantificados, consistindo então de uma extração exaustiva com acetona, filtração, partição em éter de petróleo, concentração e separação cromatográfica em coluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1), eluindo com concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (30 - 60°C). Os carotenóides são identificados pela ordem de eluição na coluna, co-cromatografia em camada delgada, pelo espectro de absorção característico de cada um e por reações químicas específicas e quantificados através do coeficiente de extinção específica (coeficiente de absorção) ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) descrito por DAVIES (1976).

Algumas amostras com alto teor de óleo ou que apresentem ésteres de hidroxicarotenóides são submetidas à saponificação, após a transferência ao éter de petróleo, através da adição de igual volume de uma solução metanólica de hidróxido de potássio e repouso por uma noite a temperatura ambiente.

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), o coeficiente de variação do método inteiro, incluindo a saponificação, é de 1,2 a 8,9% para o  $\beta$ -caroteno (concentração de 0,75 a 57,80  $\mu\text{g/g}$ ) em couve, abóbora, mamão e tomate, 7,5% para  $\alpha$ -caroteno (16,96  $\mu\text{g/g}$ ) em abóbora, 8,3% para  $\beta$ -criptoxantina (4,09  $\mu\text{g/g}$ ) em mamão e 15% para  $\gamma$ -caroteno (9,8  $\mu\text{g/g}$ ) em tomate. A recuperação total do método, usando couve como amostra, foi de 92%.

#### 2.3.4.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido cada vez mais usada na determinação de carotenóides provitamina A em alimentos. Vantagens como simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e exatidão tem sido atribuída a esta técnica (WILL III, 1984). Todavia, segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1989), uma verificação dos dados publicados revela que o potencial desta técnica não tem sido todo aproveitado e os resultados apresentados são divergentes. Ainda segundo a autora, a maioria dos métodos que utilizam a CLAE apresentam longos e laboriosos passos antes do procedimento cromatográfico. Trabalhos como o de ZAKARIA et al. (1979), que apresenta uma separação cromatográfica rápida (15 minutos), utiliza muito tempo na preparação da amostra (2 dias).

Alguns trabalhos apresentam métodos rápidos de preparação da amostra (HSIEH e KAREL, 1983; BUSHWAY e WILSON, 1982 e BUREAU e BUSHWAY, 1986), contudo, observa-se, em alguns casos, comprometimento do processo cromatográfico pelo grande número de impurezas coextraídas.

RUEDI (1985) cita, em sua revisão sobre a utilização da CLAE na análise de carotenóides, que a alta eficiência de separação desta técnica permite obter excelentes informações sobre misturas complexas que contenham estes pigmentos. GREGORY et al. (1987) conseguiu a resolução de ésteres de carotenóides inativos utilizando coluna com fase reversa (C<sub>18</sub>) e gradiente de metanol e acetato de etila.

STEWART (1977a, b), publicou dois trabalhos usando CLAE na separação de carotenóides em sucos de laranja, obtendo recuperações de 99% para  $\alpha$  - caroteno e 98% para  $\beta$  - caroteno. Vários outros estudos indicam boas recuperações para esta técnica na separação de pigmentos (BUSHWAY e WILSON, 1982; HSlEH e KAREL, 1983).

A grande maioria dos trabalhos descrevendo o uso da CLAE na separação de carotenóides provitamina A em alimentos utiliza colunas com fase reversa ( $C_{18}$ ), principalmente pelo menor risco de formação de artefatos durante a separação, em virtude das fracas forças envolvidas (LAMBERT et al., 1985). Contudo, observa-se que vários outros adsorventes tem sido empregados, como a alumina (REEDER e PARK, 1975), hidróxido de cálcio (TSUKIDA et al., 1982), óxido de magnésio, que, apesar da insuficiente estabilidade em CLAE (VECCHI et al., 1981) apresentou excelente resolução na análise de carotenóides em citros (STEWART, 1977a, b), e sílica (HAJIBRAHIM et al., 1978), que pode apresentar degradação de carotenóides durante a separação (BRAUMAN e GRIMME, 1981). Uma alternativa para se evitar as possíveis degradações provocadas por adsorventes ativos é o uso de colunas com fase ligada polar (LAMBERT et al., 1985), como a fase nitrila (-CN), utilizada por GILLAN e JOHNS (1983) na separação de carotenóides em bactérias e algas.

Outros trabalhos avaliaram colunas comerciais de fase reversa na resolução de carotenóides provitamina A, mostrando que nem todas são efetivas na separação de estereoisômeros (BUSHWAY, 1985; QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986).

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Matéria prima.

As amostras de cenoura (*Daucus carota*, L.), mamão (*Carica papaya*, L.) variedade formosa, couve (*Brassica oleracea*, L.) variedade acephala dc., tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill.) e azeite de dendê (*Elaeis guineensis*, L.) foram adquiridas em supermercados localizados no município de Campinas, escolhendo amostras que apresentassem bom aspecto.

A escolha destes produtos para o estudo baseou-se na composição de carotenóides e de possíveis interferentes analíticos. Para tanto selecionou-se a cenoura pela alta concentração de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno; a couve pela presença de isômeros do  $\beta$ -caroteno e pela possível interferência causada pela clorofila; o tomate pela alta concentração de licopeno que pode mascarar a presença de carotenóides ativos; o azeite de dendê pelo alto teor de lípidos e o mamão pela presença da criptoxantina na forma de ésteres.

#### 3.2 - Equipamento.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca INTRALAB, modelo 5000, munido de um sistema para gradiente de solventes,

detector UV/visível, modelo UV 100, com comprimento de onda variável de 190 a 700 nm, célula de 4,5 µl de volume e 4 mm de percurso óptico, injetor manual, marca RHEODYNE, modelo 7125, com "loop" de 10,0 µl, e integrador, marca INTRALAB, modelo 4290.

- Espectrofotômetro UV/visível, com duplo feixe e cubetas de 1 cm de percurso óptico, marca VAN DEN, modelo DC 2500, ligado a um registrador potenciométrico, marca INTRALAB, modelo ÔMEGA.

- Evaporador rotatório, marca TECNAL, modelo TE 120, munido com trompa de vácuo.

- Sistema de filtração "Sep-Pak cartridge rack" da MILLIPORE.

### 3.3 - Vidrarias.

As vidrarias utilizadas foram de cor ambar ou envolvidas com papel alumínio para proteção da luz difusa.

### 3.4 - Reagentes.

Os reagentes e solventes utilizados foram "para análise" ou "para cromatografia" de acordo com sua finalidade.

### 3.5 - Métodos de separação e quantificação.

3.5.1 - Método espectrofotométrico com separação por cromatografia em coluna aberta.

#### a) Preparação da amostra.

As amostras frescas e de bom aspecto foram cortadas em pequenos pedaços e encaminhadas imediatamente para análise. O azeite de dendê foi agitado, transferido para um frasco ambar e armazenado sob refrigeração em ambiente de nitrogênio.

#### b) Extração dos pigmentos.

Foram pesadas de 10 a 30 g de amostra (dependendo da intensidade de sua cor) em um Erlenmeyer de 250 ml, adicionado 100 ml de acetona e triturada por 3 minutos. O extrato foi filtrado em funil de Buchner e o resíduo retornado para nova extração. O procedimento foi repetido até a extração quantitativa dos pigmentos.

#### c) Transferência dos pigmentos para éter de petróleo.

Foi adicionado uma alíquota do filtrado a um funil de separação de 250 ml, contendo 100 ml de éter de petróleo (30 - 60°C). Adicionou-se água destilada e aguardou a separação das fa-



ses. A camada inferior (fase aquosa contendo acetona) foi descartada e o processo foi repetido até que todo o pigmento fosse transferido para o éter de petróleo. A seguir o extrato etéreo foi lavado quatro vezes com água.

d) Saponificação dos pigmentos (opcional).

Transferiu-se a fração etérea para um Erlenmeyer de 250 ml e adicionou-se igual volume de uma solução metanólica de hidróxido de potássio a 10% (p/v), agitou-se a mistura e deixou-se ao abrigo da luz por uma noite à temperatura ambiente.

A solução etérea foi novamente transferida para um funil de separação de 250 ml e lavada com água destilada, até que a água de lavagem não estivesse mais alcalina. A seguir, o extrato etéreo foi seco em uma coluna de sulfato de sódio anidro.

A solução foi concentrada em um evaporador rotativo a vácuo até aproximadamente 10 ml, transferida para um balão de 25 ml onde o volume foi completado.

e) Cromatografia em coluna aberta.

Uma coluna de vidro com 2,5 cm de diâmetro interno e 40,0 cm de comprimento, com torneira de teflon e placa porosa, foi recheada com óxido de magnésio e Hyflosupercel (1 : 2) com o auxílio de vácuo. Após a adição de uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, a coluna foi molhada com éter de petróleo (30 - 60°C).

Adicionou-se então uma alíquota (5,0 ml) do extrato obtido em 3.5.1 (d) e os pigmentos foram eluídos com uma mistura de solventes (iniciando com 5% de éter etílico em éter de petróleo, seguida de concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo) com gradiente de polaridade. O volume de cada solvente variou com as resoluções das bandas na coluna e as frações foram recebidas em balões volumétricos.

f) Identificação e quantificação dos pigmentos separados.

Cada fração separada foi lida no espectrofotômetro munido de registrador, com uma varredura de 350 a 550nm. A identificação dos carotenóides foi feita através da ordem de eluição na coluna e pelo espectro visível das frações ou, quando necessário, através de reações químicas específicas.

A concentração dos carotenóides foi obtida através do uso do coeficiente de extinção específico de cada carotenóide, retirados da tabela apresentada por DAVIES (1976), e expressa em  $\mu\text{g}$  de carotenóide por 100 g de amostra.

### 3.5.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os procedimentos de preparação das amostras, extração dos pigmentos, transferência para éter de petróleo e saponificação, quando necessária, foram os mesmos utilizados na técnica anterior (3.5.1). Do extrato etéreo obtido em 3.5.1 d foram retiradas duas alíquotas de 1,0 ml, sendo uma eluída através de uma mi-

nicoluna contendo óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1) com uma mistura de 5% de acetona em éter de petróleo (30 - 60 C) e a outra filtrada. Após a adição de padrão interno, ambas foram injetada diretamente no cromatógrafo (Figura 4).

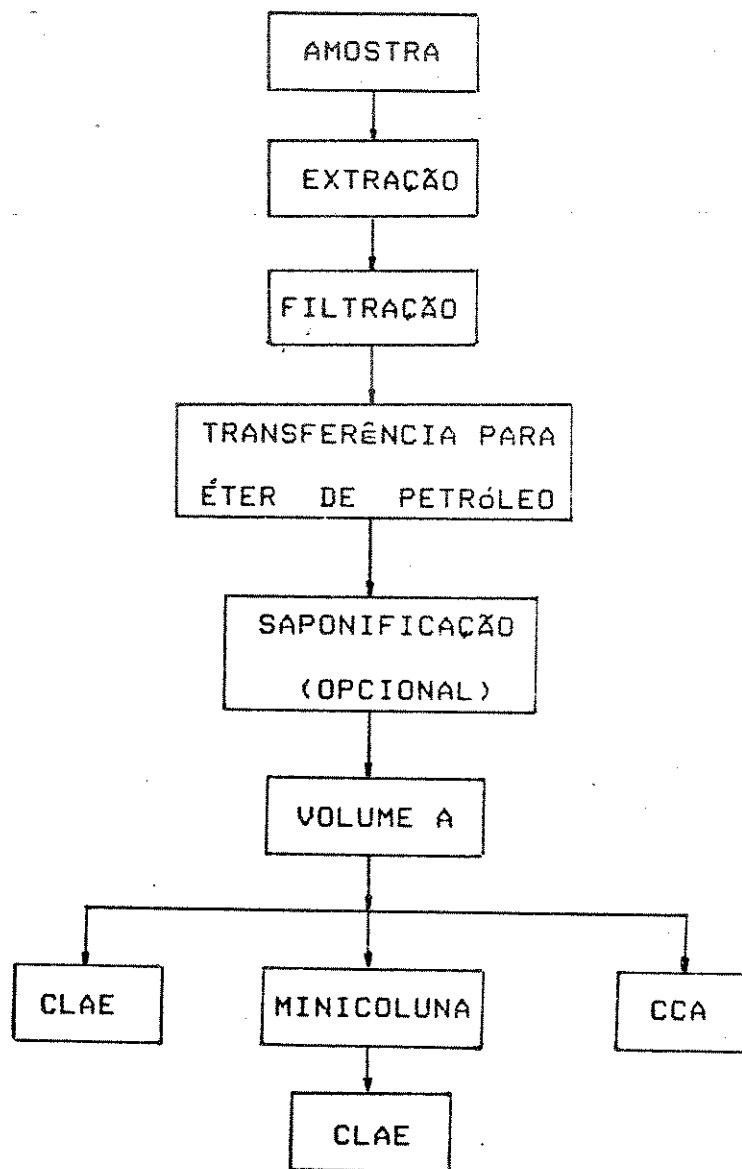


Figura 4. Fluxograma do estudo de carotenóides provitamina A.

a) Separação em minicoluna.

Uma pequena coluna com 9 mm de diâmetro interno, 60 mm de comprimento e com placa porosa fina foi recheada com aproximadamente 20 mm de uma mistura de óxido de magnésio e Hyflosuperce (1:1). Após a adição de uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, a coluna foi conectada ao sistema de filtração e uma pressão reduzida de aproximadamente 3300 Pa foi mantida durante toda a separação.

Uma alíquota do extrato etéreo foi adicionada à coluna e os pigmentos foram eluidos com 10,0 ml de uma mistura de 5% de acetona em éter de petróleo (30 - 60 °C). O eluido foi evaporado em fluxo de nitrogênio, retomado em acetona, filtrado e injetado no cromatógrafo após a adição de padrão interno.

b) Separação por cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia obedeceu as seguintes condições: coluna tipo LICROART com 125 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno; com fase estacionária LICROSPHER 100, RP-18, 5 µm, E. MERCK artigo 50823, lote n. 611956, munida de pré coluna RP-18 E. MERCK artigo 50803; fase móvel metanol:acetona (95:5) com uma vazão de 0,8 ml por minuto. Detector com comprimento de onda de 470 nm atenuação de 0,02 AU/MV; injetor RHEODYNE com "loop" de 10 µl integrador com velocidade de papel de 0,5 cm/min.

### c) Quantificação dos pigmentos separados por CLAE.

Na quantificação dos carotenóides provitamina A separados por CLAE foram utilizados os métodos de padronização externa e interna.

Na quantificação por padronização externa foram utilizados como padrões, os carotenóides provitamínicos separados por CCA e positivamente identificados e quantificados.

A padronização interna foi realizada pela adição de quantidades conhecidas de Sudan I (1 - (fenilazo) 2 - naftalenol) ao extrato obtido pela clarificação na minicoluna. As relações de concentração (curvas de calibração) foram obtidas através do uso dos carotenóides provitamínicos separados por CCA e positivamente identificados e quantificados.

### 3.6 - Reações químicas utilizadas na confirmação da identidade dos carotenóides provitamina A.

Várias reações químicas foram utilizadas para confirmar a identidade dos carotenóides separados, através da identificação do tipo de substituinte e sua localização na molécula.

#### 3.6.1 - Presença de grupos 5,6-epóxidos.

A presença de grupos 5,6-epóxidos foi verificada pela diminuição nos comprimentos de ondas do espectro (efeito hipso-crômico) após a adição de ácido clorídrico 0,1 M a uma solução

etanólica do pigmento. Esta modificação no comprimento de onda se deve à transformação do 5,6-epóxido em 5,8-epóxido que desloca os máximos de absorbância em 20 nm para um grupo epóxido e 40 nm para dois grupos epóxidos (DAVIES, 1976).

### 3.6.2 - Confirmação da configuração cis ou trans.

A configuração trans foi confirmada pelo deslocamento hipsocrômico após a adição de duas gotas de uma solução etérea de iodo a uma solução etérea de carotenóides e exposição à luz por cinco minutos. A configuração cis pode apresentar um deslocamento batocrômico quando submetida à mesma reação (DAVIES, 1976).

### 3.6.3 - Presença de grupos hidroxilas.

A presença de hidroxilas alílicas, isoladas ou conjugadas, foi confirmada pela adição de algumas gotas de HCl 0,2 M ao pigmento dissolvido em metanol, repouso por três horas no escuro, à temperatura ambiente, e injeção no cromatógrafo. A reação positiva é indicada por uma alteração no tempo de retenção quando comparado com o pigmento original (DAVIES, 1976).

Os carotenóides que não apresentaram reação à metilação foram, se necessário, submetidos à reação de acetilação, que reage com hidroxilas secundárias alílicas ou não.

A acetilação foi efetuada pela adição de 0,2 ml de anidrido acético ao pigmento dissolvido em 2,0 ml de piridina, com repouso por 21 horas no escuro a temperatura ambiente. O pigmento

foi então cromatografado e a reação positiva foi indicada pela alteração nos tempos de retenção dos carotenóides acetilados (DAVIES, 1976).

### 3.7 - Cálculo do valor de vitamina A.

Para se obter o valor vitamínico de cada amostra foi considerado a atividade vitamínica de cada carotenóide segundo BAUERFEIND (1972) onde o trans -  $\beta$ -caroteno apresenta 100% de atividade vitamínica e os demais carotenóides provitamina A, 50%. O isômero cis do  $\beta$  - caroteno apresenta 38% de atividade vitamínica (DEUEL et al., 1945).

De acordo com a National Academy of Science - National Research Council (NAS - NRC, 1980), 1 UI de vitamina A é equivalente a 0,6  $\mu$ g de  $\beta$  - caroteno e 1,2  $\mu$ g dos demais carotenóides provitamina A.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1 - Extração dos pigmentos.

A utilização, no presente trabalho, de uma única extração para os dois procedimentos cromatográficos (CLAE e CCA) permitiu a comparação clara da separação dos pigmentos entre ambos os métodos.

A saponificação, evitada sempre que possível, foi utilizada em dois casos: para a análise de azeite de dendê em coluna aberta, cujo extrato dificulta a eluição cromatográfica, e na análise de mamão, onde a presença de criptoxantina em diferentes formas ésteres dificulta a identificação, tornando o procedimento de saponificação vantajoso.

A transferência dos pigmentos para éter de petróleo foi, também, necessária para a separação cromatográfica e para a clarificação do extrato em minicoluna.

### 4.2 - Separação dos pigmentos.

#### 4.2.1 - Cromatografia em coluna aberta.

Na cromatografia em coluna aberta optou-se pela separação individual dos carotenóides em detrimento dos métodos oficiais que, como já foi dito neste trabalho, apesar de usarem cro-



matografia, não separam as provitaminas individualmente, tornando-se grandes fontes de erro na determinação do valor vitamínico dos alimentos.

A separação foi obtida através da eluição com misturas de solventes de polaridades crescentes, iniciando com uma mistura de 5% de éter etílico em éter de petróleo (30 -60°C) seguindo de concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (5%, 10%, 20%, etc.). Os volumes utilizados de cada fração variaram de amostra para amostra e foram função da separação das bandas observadas na coluna. Foram considerados apenas os carotenóides com atividade vitamínica.

Apesar desta simplificação observa-se ser necessário uma boa acuidade visual para se distinguir a separação das bandas cromatográficas. Em amostras que apresentam concentrações muito diferentes de carotenóides pode se observar alguma dificuldade na resolução.

Outro aspecto da técnica de CCA é a dificuldade de reprodutibilidade das colunas preparadas, onde pequenas alterações nos parâmetros de recheio implicam em diferença de resolução. Para tanto torna-se necessário alguma experiência no recheio deste tipo de coluna para se obter separações reprodutivas.

A separação de estereoisómeros não foi observada na coluna utilizada, o que causa uma potenciação nos valores de vitamina A calculados.

A Figura 5 mostra os espectros obtidos a partir de uma amostra de cenoura, com os respectivos cromatogramas obtidos posteriormente na CLAE. Observa-se que, apesar de identificado na

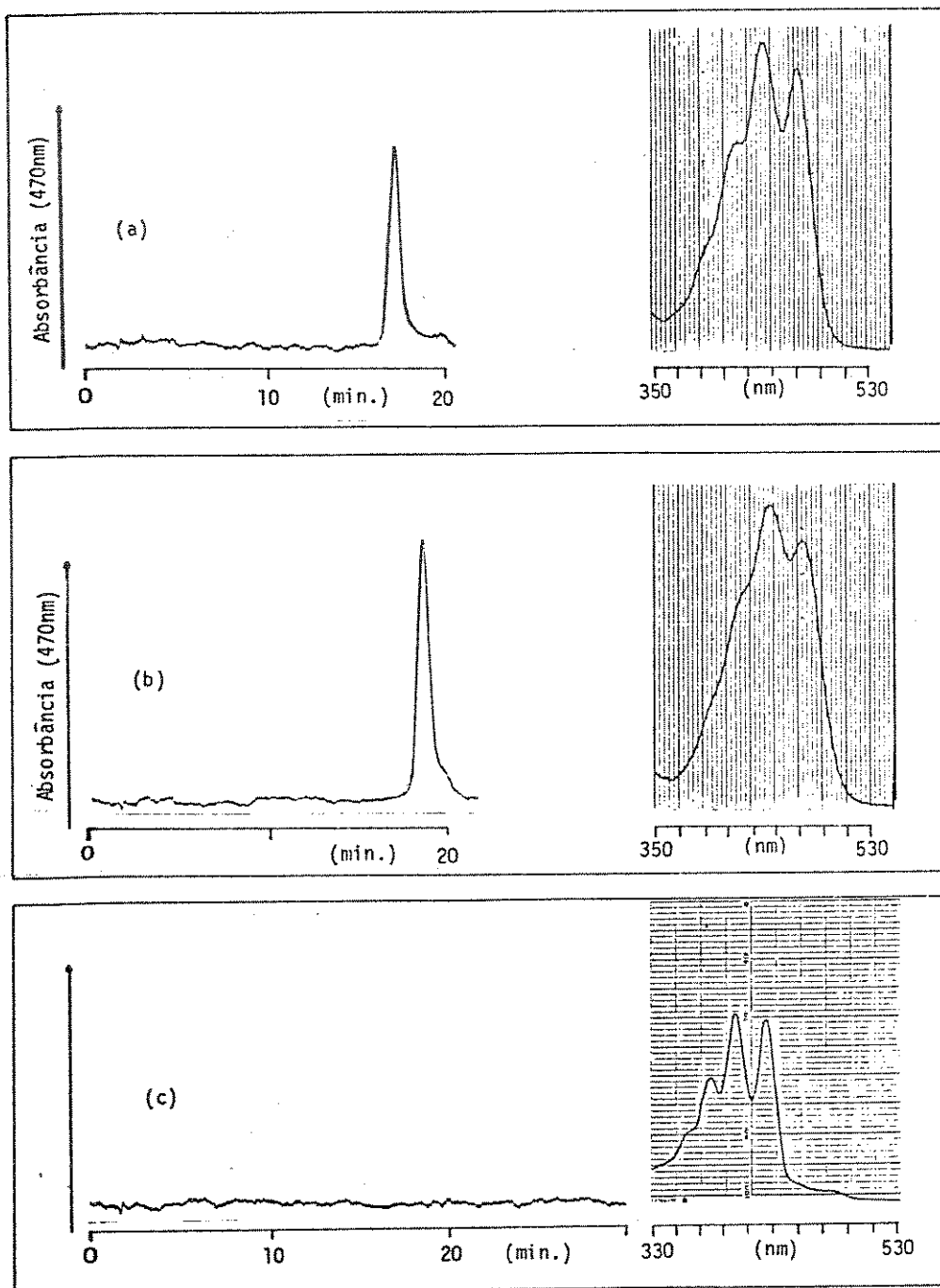


Figura 5. Cromatogramas (CLAE) com detecção a 470nm e espectros de absorção no UV-visível, obtidos das frações de uma amostra de cenoura separada por CCA: (a)  $\alpha$ -caroteno (fração 1); (b)  $\beta$ -caroteno (fração 2) e (c)  $\xi$ -caroteno (fração 3). As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b)

CCA, o  $\zeta$  caroteno (sem atividade vitamínica) não é percebido na CLAE em virtude do comprimento de onda usado na detecção (470 nm).

#### 4.2.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A escolha da utilização da coluna de fase reversa (C-18) na CLAE se deu principalmente em função de seu uso generalizado em trabalhos deste tipo, sendo que apresentam como justificativa o menor risco de formação de produtos de degradação durante a cromatografia, dada as fracas forças envolvidas na separação (LAMBERT et al, 1985). Outra razão é a facilidade de se encontrar este tipo de coluna no mercado.

Evitou-se ainda o uso de gradiente de fase móvel, pelo grande tempo perdido, entre as injeções, para a reestabilização do sistema e, também, para possibilitar que aparelhos que operam apenas no sistema isocrático efetuem esta análise.

Dentro destas restrições foram testadas como fase móvel, além de metanol puro, misturas de metanol com água, acetona ou clorofórmio, em concentrações variadas, e a que melhor se comportou foi a mistura de metanol : acetona (95:5), permitindo uma boa resolução entre as diversas formas dos carotenóides provitamínicos estudados, incluindo a separação parcial de estereoisômeros.

Além da fase móvel escolhida observou-se uma eficiência similar em uma mistura de metanol : clorofórmio (95:5), que também pode ser utilizada nesta separação.

O comprimento de onda usado neste estudo foi de 470 nm. Todavia, observa-se pela Figura 6 que outros comprimentos de onda podem ser usados sem grandes alterações no cromatograma de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno. Nota-se uma pequena diminuição na absorbância do padrão interno nestes outros valores (450, 445, 440 e 436 nm).

A resolução entre os isômeros cis e trans do  $\beta$ -caroteno não foi boa na coluna usada neste estudo (Figura 7). Tendo em vista o trabalho de QUACKENBUSH & SMALLIDGE (1986), onde de vinte colunas comerciais tipos C-8 ou C-18 testadas, somente tres apresentaram alguma separação destes estereoisômeros, o resultado apresentado indica muito mais a necessidade de se procurar colunas mais eficientes do que interpretar esta má resolução como deficiência do método.

#### 4.3 - Identificação dos carotenóides provitamina A.

A utilização de técnicas analíticas como a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear para a identificação de carotenóides esbarra nos custos e na dificuldade operacional que inviabiliza seus usos em análises de rotina, ficando restrita à pesquisa e elucidação de estruturas de carotenóides desconhecidos.

Na análise rotineira de provitaminas conhecidas pode se combinar técnicas tradicionais como a cromatografia e a espectrofotometria, onde o relacionamento entre o espectro e a estrutura

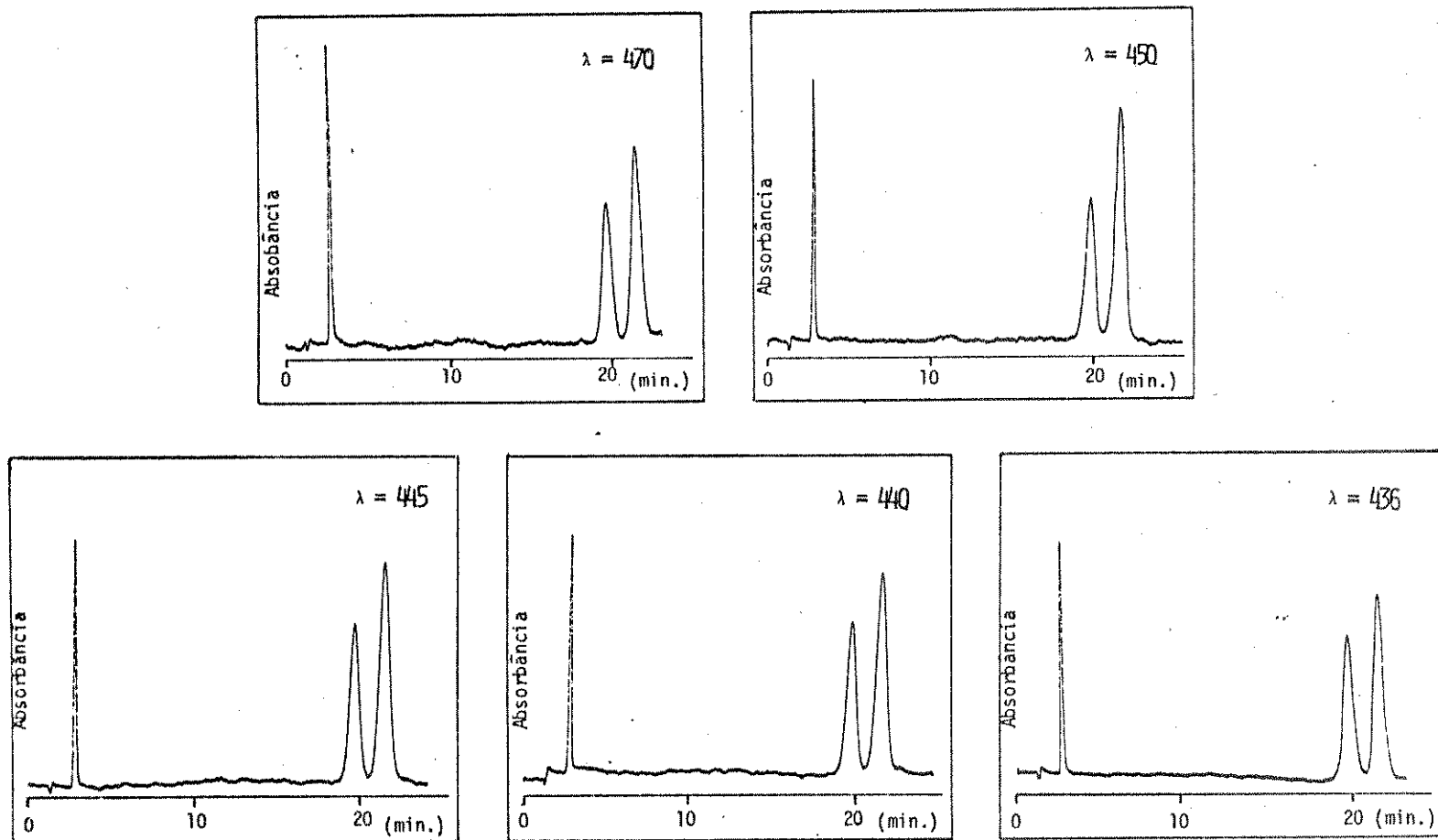


Figura 6. Cromatogramas (CLAE) obtidos a partir de uma amostra de cenoura ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno) usando comprimentos de ondas de: 470, 450, 445, 440 e 436 nm. Fase móvel: Metanol:Acetona (95:5). As demais condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b).

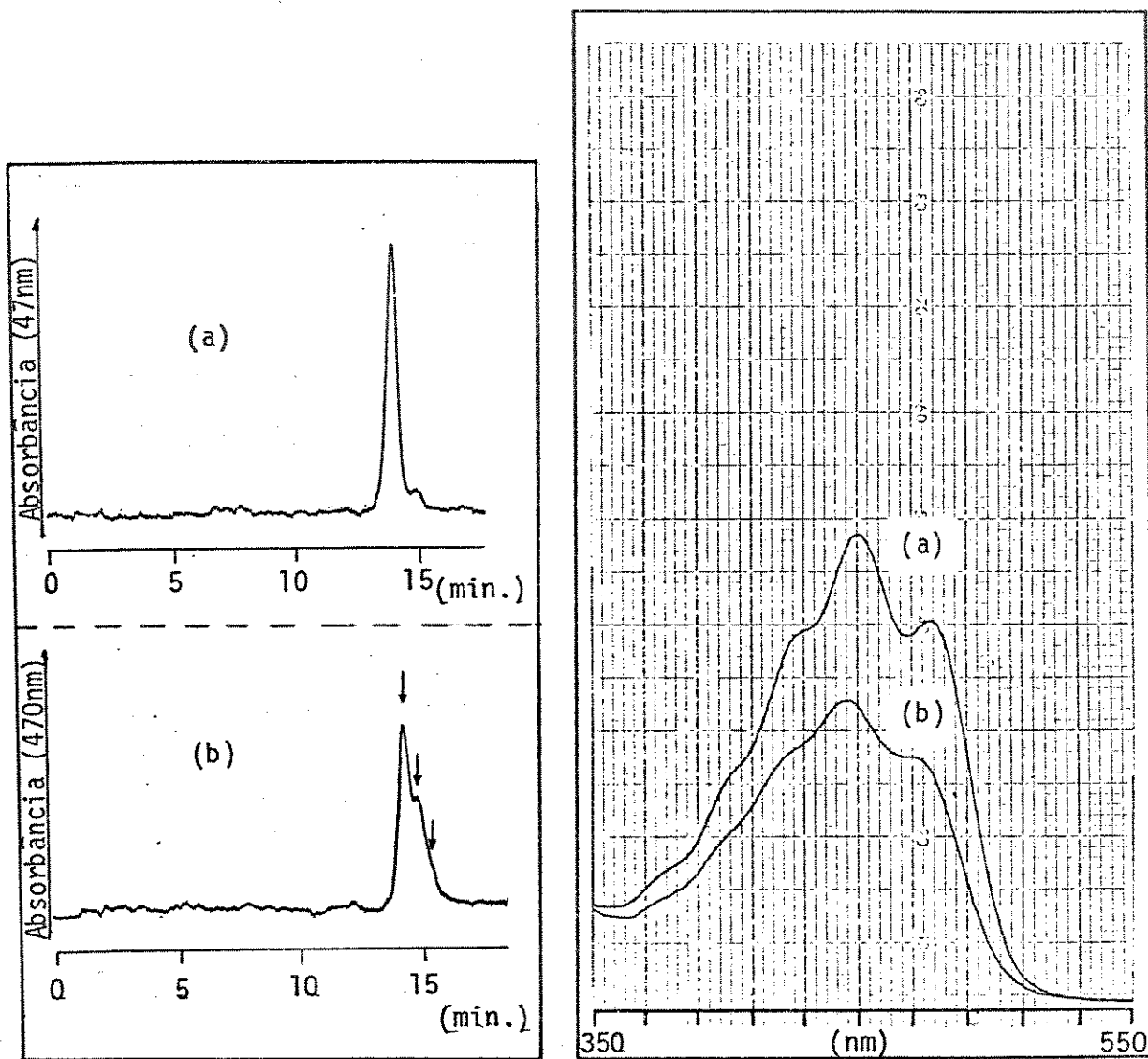


Figura 7. Cromatograma (CLAE) e espectro de absorção de uma solução de trans- $\beta$ -caroteno, antes (a) e depois (b) de isomerização química. As setas destacam a presença de trans, 9-cis e 13-cis- $\beta$ -caroteno respectivamente. As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5 2.b).

dos carotenóides tem sido minuciosamente discutido em várias monografias (VETTER et al, 1971; DAVIES, 1976, GOODWIN, 1980; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Este relacionamento foi utilizado neste trabalho para a identificação dos carotenóides, aliado à ordem de eluição cromatográfica ( ou tempo de retenção) e a reações químicas específicas.

No presente trabalho os carotenóides provitamínicos, separados na cromatografia em coluna aberta e positivamente identificados e quantificados, foram imediatamente utilizados como padrões para a cromatografia líquida de alta eficiência. Esta operação tornou-se necessária no início dos estudos, para se estabelecer relações entre os diversos pigmentos estudados e o padrão interno, além de facilitar suas identificações e quantificações.

A identificação dos pigmentos foi, em alguns casos, confirmada por reações químicas específicas, como no estudo de isômeros, onde o deslocamento hipsocrômico do espectro e o aparecimento de um novo pico no cromatograma, após a isomerização química de uma solução de trans-  $\beta$  -caroteno pode ser percebida (Figura 7).

O tempo de retenção em CLAE dos estereoisômeros do  $\beta$  -caroteno foram confirmados através da separação individual dos isômeros cis e trans em uma coluna aberta de hidróxido de cálcio com eluição com éter de petróleo. As bandas eluídas foram separadas e, após leitura espectrofotométrica, injetadas no cromatógrafo líquido. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8 e indicam uma sobreposição dos picos dos isômeros

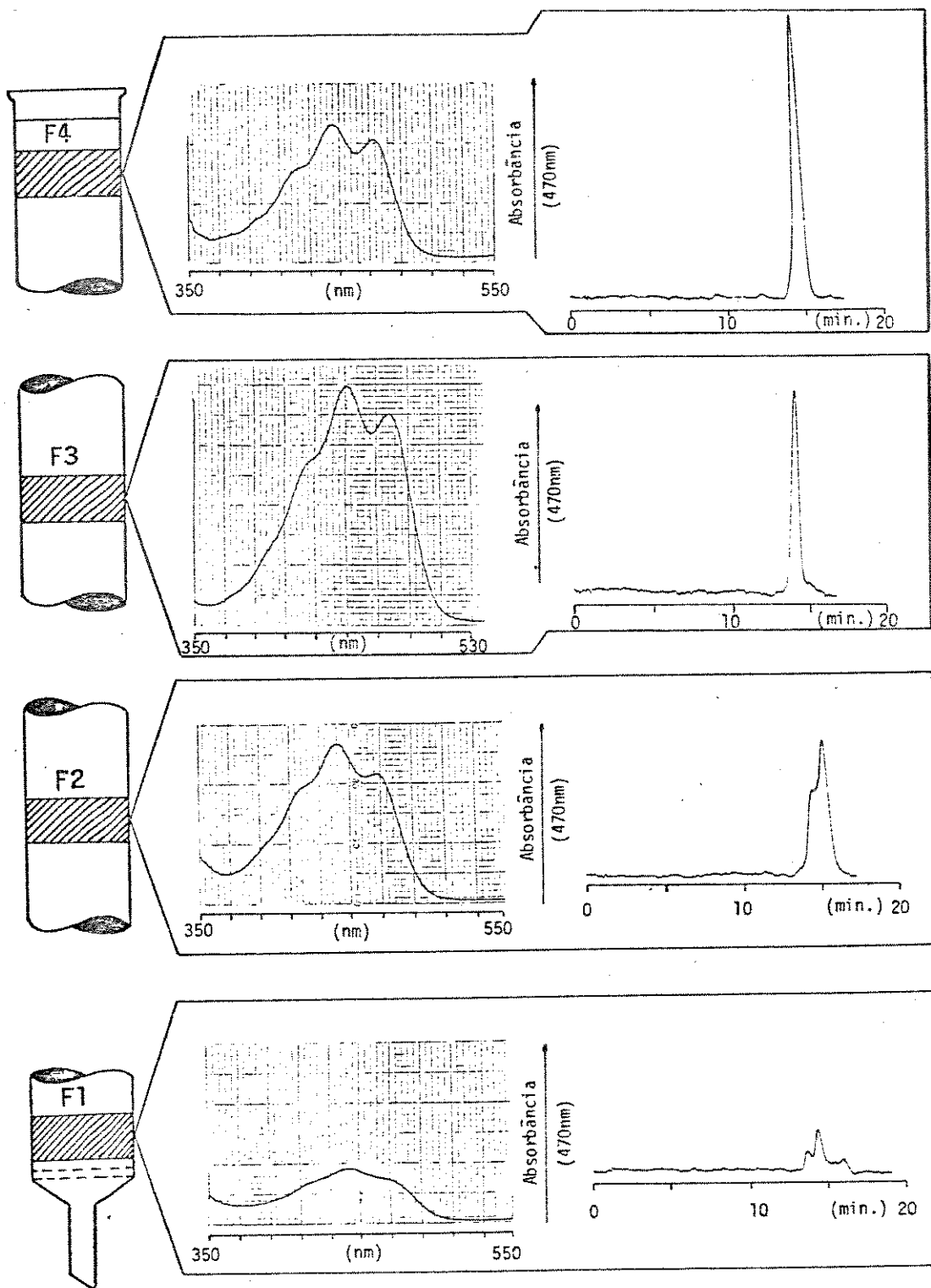


Figura 8. Separação de estereoisômeros de  $\beta$ -caroteno em CCA ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e CLAE (C-18). Os tempos de retenção (minutos) para CLAE foram os seguintes:  $F_1 = 14,8$  (para o maior pico);  $F_2 = 15,7$  (13-cis- $\beta$ -caroteno);  $F_3 = 14,4$  (trans- $\beta$ -caroteno) e  $F_4 = 15,2$  (9-cis- $\beta$ -caroteno). As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b).



9-cis e 13-cis-  $\beta$  -caroteno.

As diferenças de concentrações dos estereoisômeros, muito mais elevadas para o isômero trans que para os isômeros cis, dificulta a quantificação, principalmente em cromatogramas mal resolvidos, o que mais uma vez vem confirmar a necessidade de se trabalhar com colunas mais eficientes na análise destes pigmentos.

Outra confirmação por reação química ocorreu na análise de mamão, onde estão presentes, entre outros, a  $\beta$  - criptoxantina e a 5,6-monoepóxido-  $\beta$  -criptoxantina. Deste modo o derivado epóxido foi identificado pelo desaparecimento de seu pico após a reação do extrato etanólico com ácido clorídrico, consistente com a sua transformação em 5,8-monoepóxido-  $\beta$  -criptoxantina, que absorve em comprimentos de onda 20 nm mais baixo, portanto não sendo detectada a 470 nm, (Figura 9).

#### 4.4 - Quantificação dos carotenóides próvitamina A.

Uma das maiores dificuldades com que se depara o analista de carotenóides é a dificuldade de se obter padrões analíticos confiáveis. Pouco são os carotenóides que podem ser encontrados no mercado e quando encontrados devem ter suas concentrações confirmadas. QUACKENBUSH e SMALLIDGE (1986) encontraram em padrões de trans-  $\beta$  -caroteno percentagens deste composto que variavam de 0,6 a 88,7% de fornecedores diferentes e variações de 23,4 a 81,0% de um mesmo fornecedor. Estas dificuldades, aliadas à labilidade destes pigmentos, têm contribuído para que haja mui-

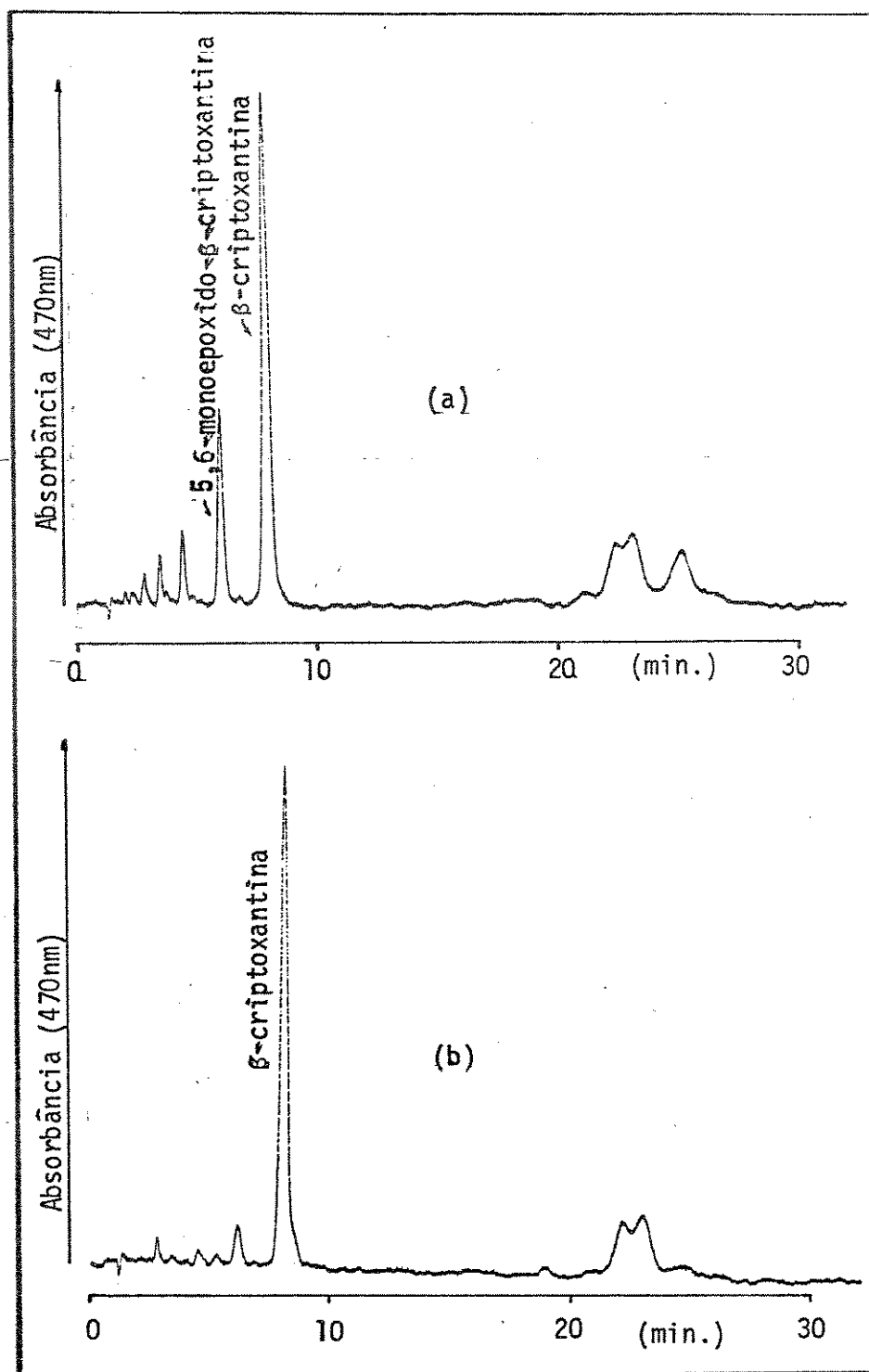


Figura 9. Cromatogramas (CLAE) de um extrato de mamão (a) antes e (b) depois de reação com HCl. As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b).

tas confusões tanto na identificação como na quantificação dos carotenóides.

Vários trabalhos demonstram que as soluções padrões de carotenóides podem sofrer rápida degradação (THOMPSON, 1981; QUACKEMBUSH e SMALLIDGE, 1986), tornando necessário que os padrões analíticos utilizados sejam purificados e as soluções preparadas recentemente, além de sempre serem verificados espectrofotometricamente.

Todavia estas operações tornam as análises longas e complicadas, fugindo dos objetivos da CLAE. Tendo isso em vista vários trabalhos recorreram à padronização interna, utilizando para isto padrões de carotenóides sintéticos, como o  $\beta$ -apo-8'-carotenal (NOGA e LENZ, 1983; KHACIK et al., 1986), a cantaxantina (BARANYAI et al., 1982) e o decapreno- $\beta$ -caroteno (KHACIK e BUCHER, 1985). Contudo o problema de estabilidade destes compostos usados como padrões continuam, fazendo com que outra alternativa fosse buscada. QUACKEMBUSH e SMALLIDGE (1986) utilizaram em seu trabalho uma solução de Sudan I (1-(fenilazo)2-naftalenol (Figura 10)) como padrão interno que, apesar de não ter a mesma estrutura dos pigmentos estudados, apresenta várias características similares, como a solubilidade e o espectro de absorção, além de resolver o problema de estabilidade dos padrões analíticos.

O grande inconveniente de sua utilização é a sobreposição do seu tempo de retenção com os tempos de retenção da clorofila, dos hidroxicarotenóides e polihidroxicarotenóides (Figura 11). Neste trabalho procurou-se resolver o problema de separação destes interferentes analíticos de modo a não ter que se recorrer

SUDAN I

1 - (fenilazo) 2 - naftalenol

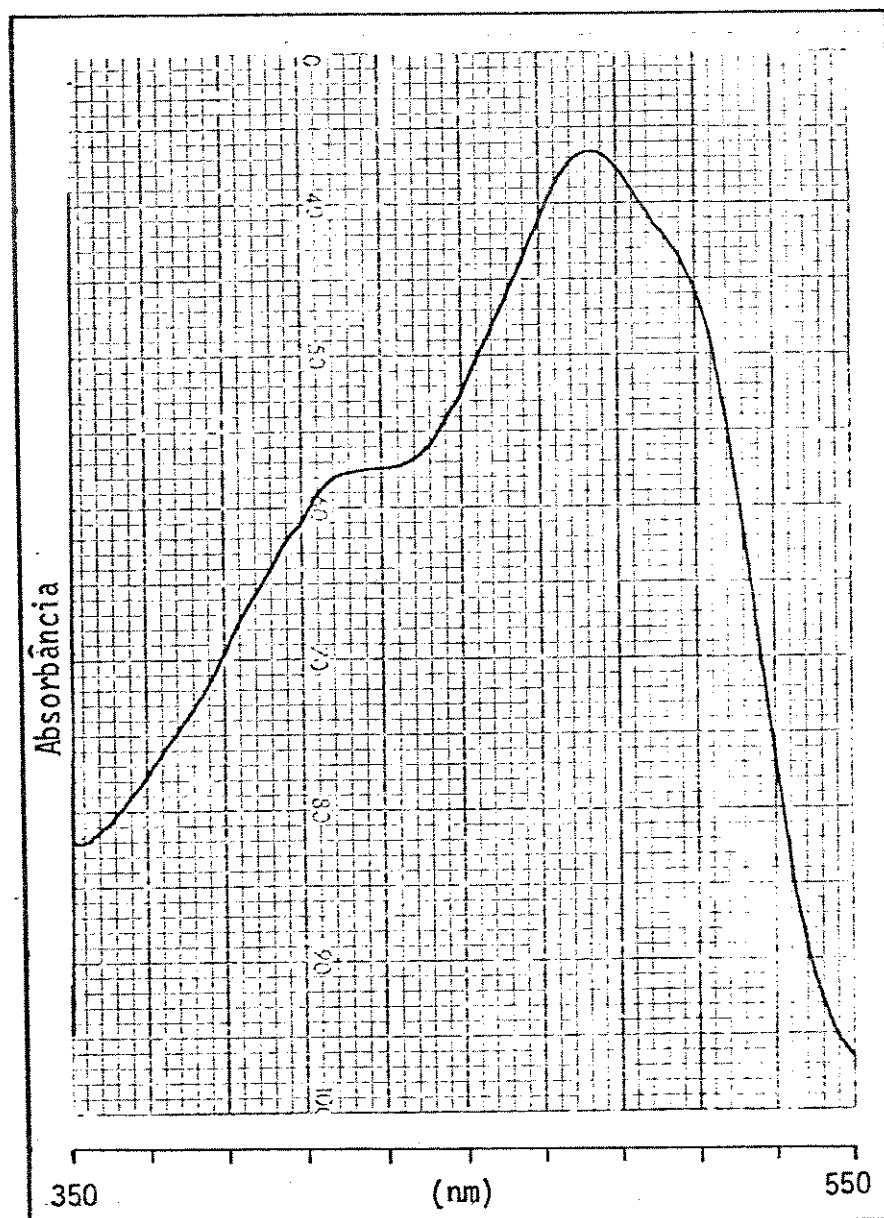
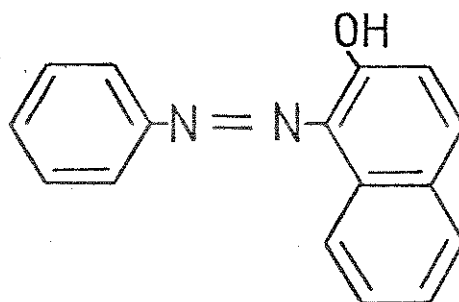


Figura 10. Fórmula estrutural e espectro de absorção de Sudan I (1-(fenilazo)2-naftalenol) em metanol.

à técnica de saponificação, que aumenta o tempo analítico em 12 horas (saponificação a frio) e pode possibilitar uma degradação destes pigmentos. Para tanto foi utilizada a separação cromatográfica em uma minicoluna (descrita em 3.5.2, a). Esta alternativa mostrou-se muito eficiente e rápida (5 minutos), evitando o inconveniente da saponificação. A Figura 11 mostra os cromatogramas de dois extratos de couve, onde (b) foi injetado imediatamente após os procedimentos de extração e (c) após a separação na minicoluna, mostrando claramente a retenção de interferentes analíticos que apresentam tempo de retenção coincidentes com o padrão interno utilizado (Sudan I) (a).

Outra grande vantagem da utilização desta pré separação é apresentada na análise de amostras que apresentam concentrações bem mais elevadas de carotenóides inativos que carotenóides com atividade vitamínica. Este é o caso da análise de tomate, onde o carotenóide presente em maior concentração é o licopeno, que não apresenta atividade vitamínica e tem seu tempo de retenção, nas condições analíticas utilizadas neste estudo, próximo ao tempo de retenção do  $\beta$ -caroteno. A resolução destes compostos fica prejudicada pela grande diferença de concentrações, com a sobreposição das bases dos picos. A pré separação permite a eliminação completa do licopeno, permitindo um cromatograma claro do  $\beta$ -caroteno presente (Figura 12).

Nas Figuras 13, 14 e 15 estão apresentadas as curvas de calibração para  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, utilizando Sudan I como padrão interno.

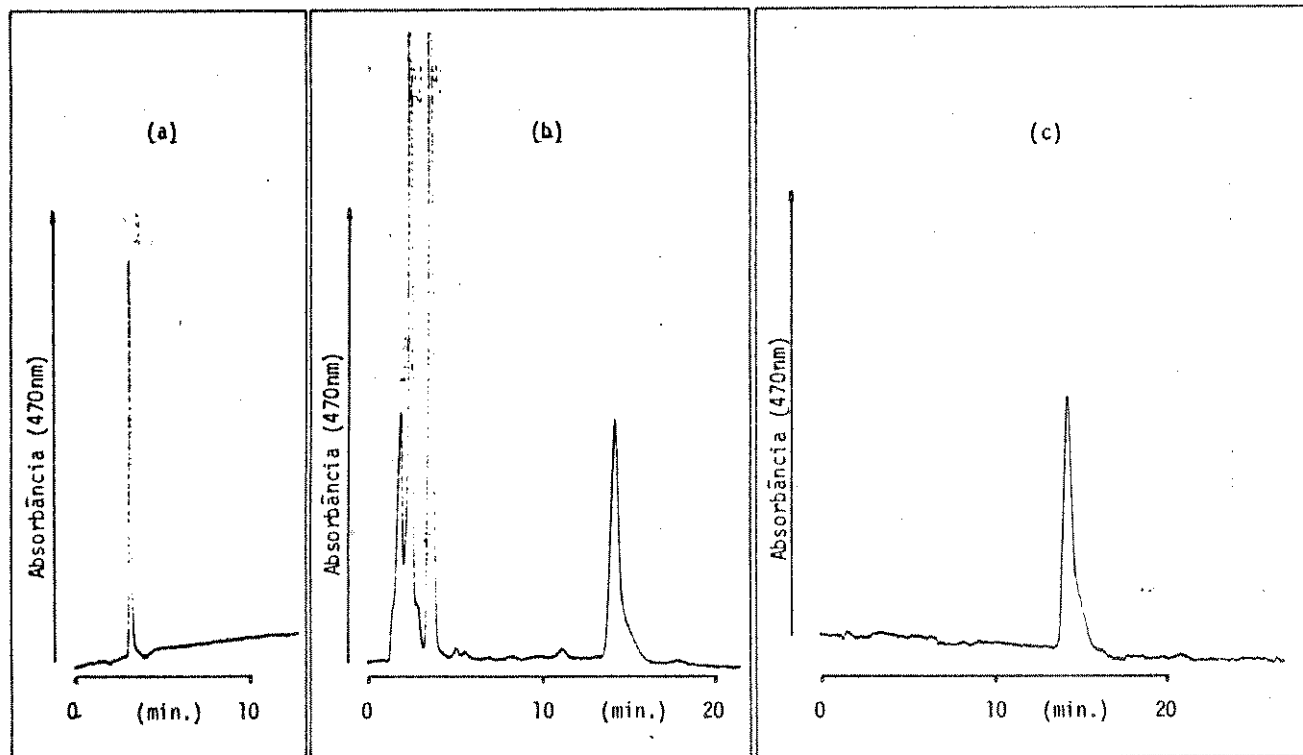


Figura 11. Cromatogramas (CLAE) de (a) Sudan I; (b) extrato de couve antes da separação em micro coluna e (c) extrato de couve após a separação em micro coluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1). As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b).

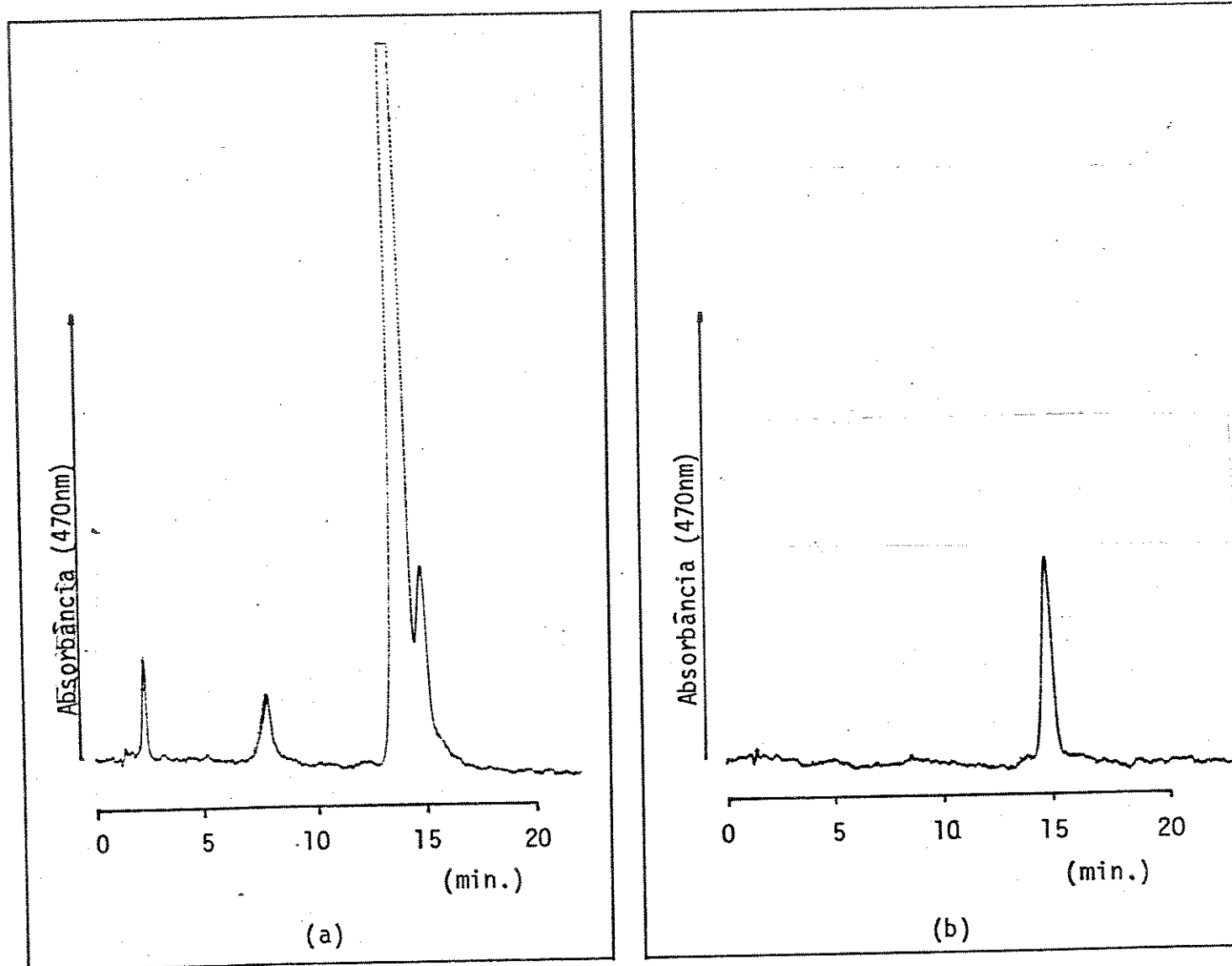


Figura 12. Cromatogramas (CLAE) de uma amostra de tomate com (a) injeção antes da separação em micro coluna e (b) injeção após a separação em micro coluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1). As condições cromatográficas estão no texto (seção 3.5.2 b).

CURVA PADRÃO INTERNO PARA BETA-CAROTENO

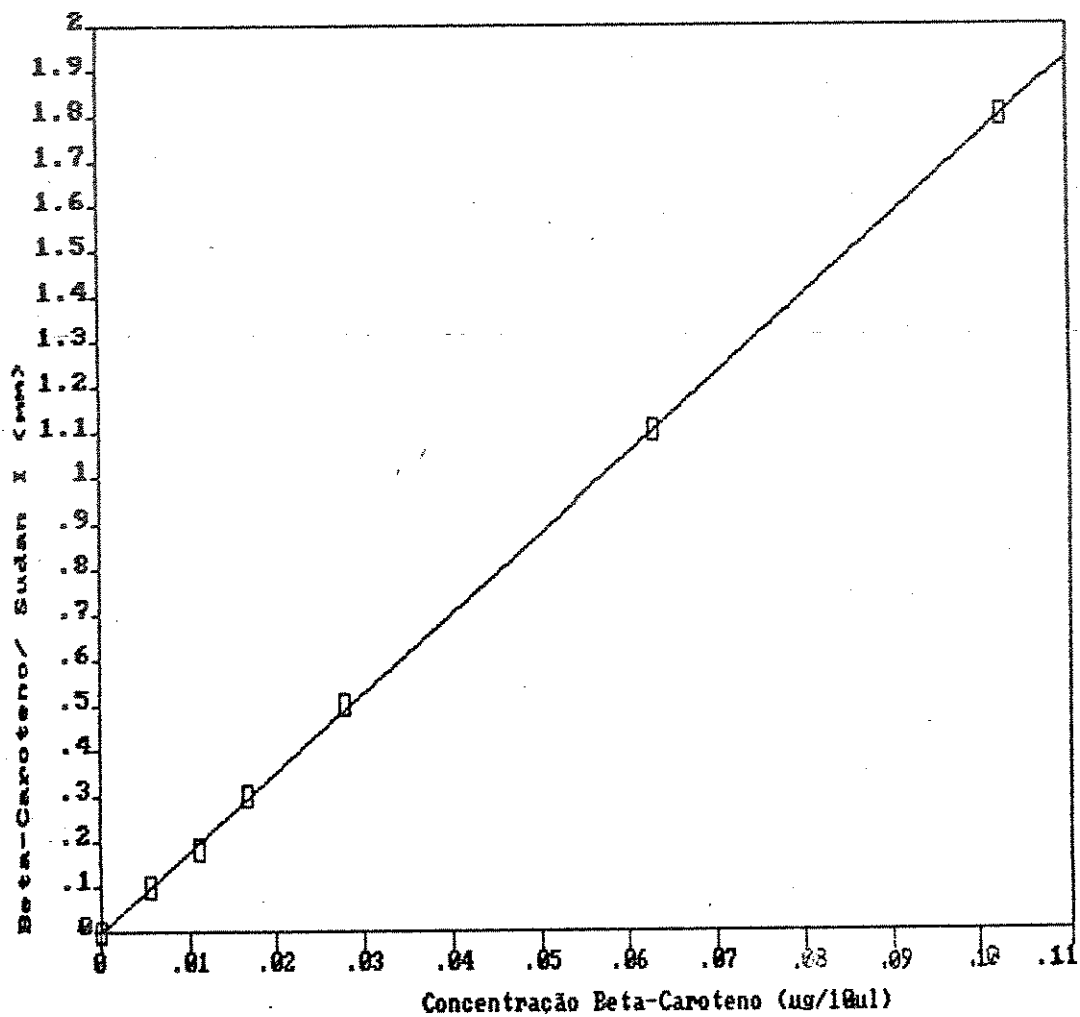


Figura 13. Curva de calibração para  $\beta$ -caroteno, utilizando Sudan I como padrão interno, na concentração de  $0,042\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ .



CURVA PADRÃO INTERNO PARA ALFA-CAROTENO

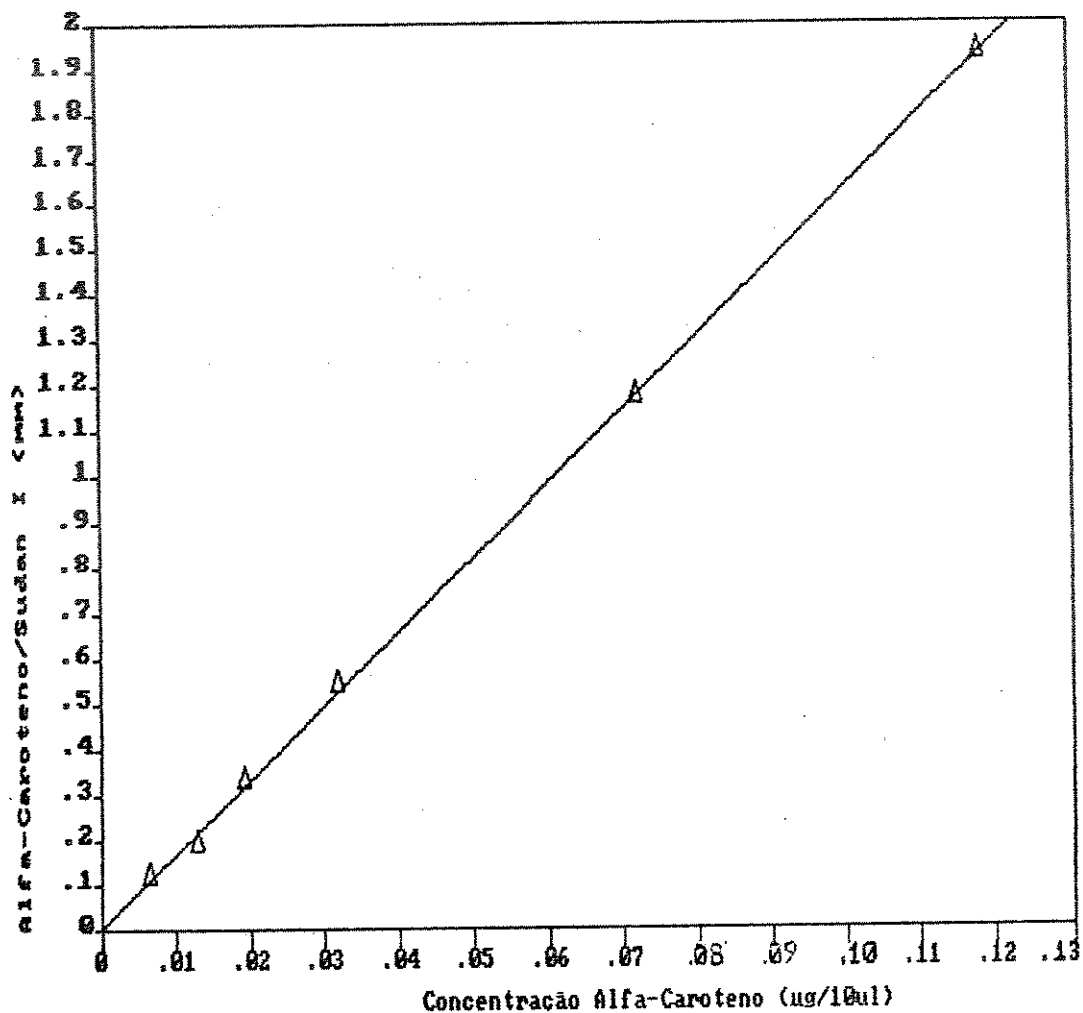


Figura 14. Curva de calibração para  $\alpha$ -caroteno, utilizando Sudan I como padrão interno, na concentração de 0,042 $\mu$ g/10 $\mu$ l.

CURVA PADRÃO INTERNO BETA-CRIPTOXANTINA

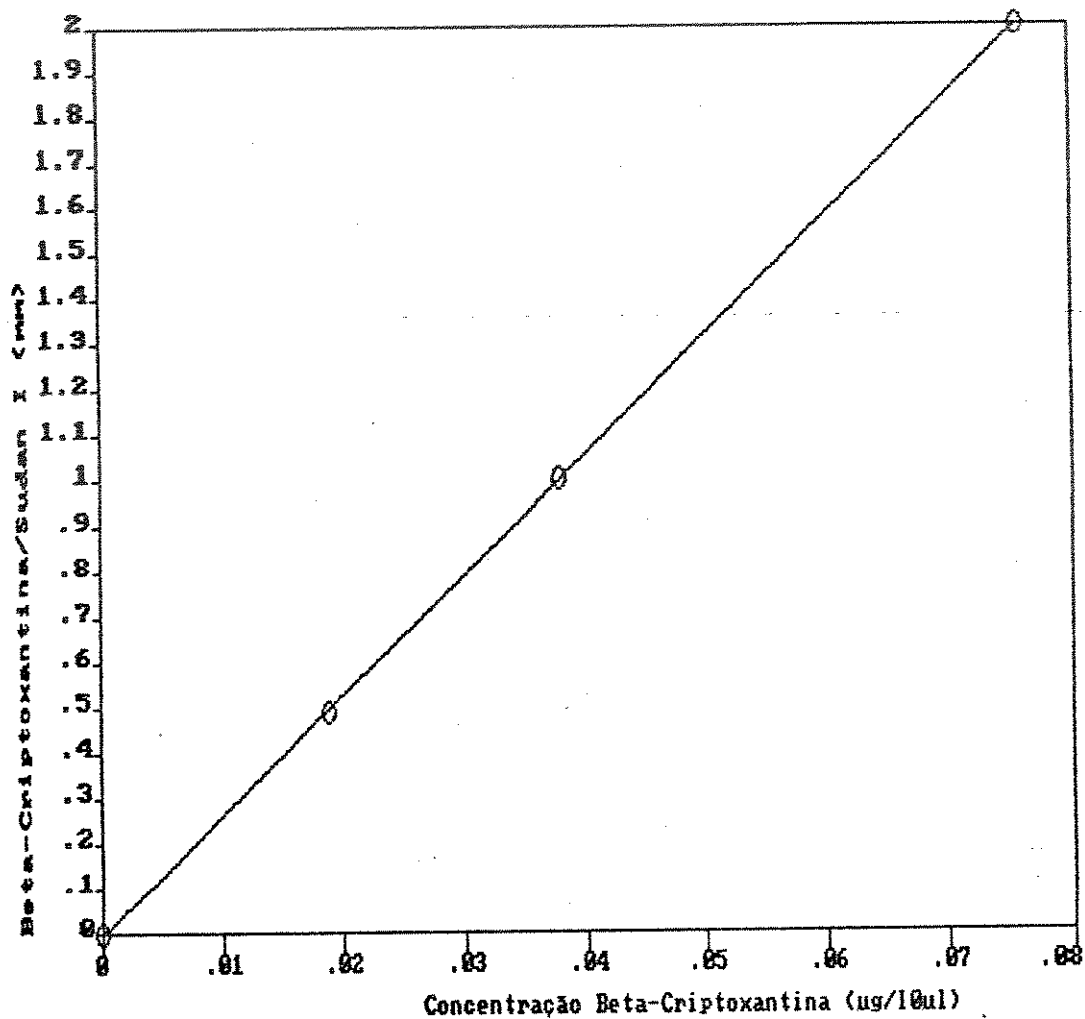


figura 15. Curva de calibração para  $\beta$ -criptoxantina, utilizando Sudan I como padrão interno, na concentração de  $0,052\mu\text{g}/10\mu\text{l}$

#### 4.5 - Recuperações analíticas.

Os processos de extração, filtração e partição em éter de petróleo foram comuns, no estudo de recuperação analítica, para ambos os processos de separação (CCA e CLAE), procurando com isso obter dados que permitam uma comparação efetiva destes procedimentos nos aspectos que os diferenciam.

Para tanto foi utilizado um padrão de  $\beta$ -caroteno, onde da fração etérea foram retiradas alíquotas para (a) separação em coluna aberta e avaliação espectrofotométrica; (b) separação por CLAE com purificação em minicoluna de óxido de magnésio e Hyflosupercel (1:1) e (c) separação por CLAE com injeção direta. O estudo de recuperação foi realizado a nível de 200  $\mu\text{g/ml}$ .

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos, onde observa-se pelos valores resultantes da injeção direta, que a maior perda ocorreu nos processos de extração, filtração e partição em éter de petróleo, chegando neste estudo a aproximadamente 8%. Este alto valor pode ser, em parte, devido a alta concentração da solução usada (200  $\mu\text{g/ml}$ ) que dificulta os passos iniciais da análise, mas que foi necessário para se ter o mesmo extrato para os diversos procedimentos cromatográficos. Nos processos de separação em minicoluna e CCA, foram registradas perdas de aproximadamente 4%.

Neste estudo não foi realizado o processo de saponificação, mas os dados literários indicam uma perda de aproximadamente 1% para o  $\beta$ -caroteno, quando submetido a este procedimento (KIMURA & RODRIGUEZ AMAYA, 1987).

Tabela 5. Resultados do estudo de recuperação analítica de  $\beta$  -caroteno para as técnicas de CCA e CLAE.

Técnica analítica	% recuperação
CLAE - Injeção direta (Padronização interna)	91,75 $\pm$ 6,28
CLAE - Injeção direta (Padronização externa)	91,67 $\pm$ 4,26
CLAE - Minicoluna (Padronização interna)	87,57 $\pm$ 4,96
CLAE - Minicoluna (Padronização externa)	86,49 $\pm$ 5,97
CCA	87,46 $\pm$ 15,42

4.6 - Determinação de provitamina A em algumas amostras reais.

Na Tabela 6 são apresentados alguns resultados analíticos com a utilização de padronização interna e externa nos processos de CLAE, onde se observa que ambos procedimentos apresentam resultados similares, indicando a padronização interna com Sudan I um processo viável para estes estudos.

Observa-se ainda que na análise de azeite de Dende houve uma má separação de  $\alpha$  e do  $\beta$  -caroteno na CCA que, aliada à

não separação de estereoisômeros, causa uma potenciação nos valores de vitamina A calculados. Esta má resolução das bandas foi observada através da injeção no cromatógrafo líquido das frações separadas em CCA (Figura 16).

A não separação de estereoisômeros em CCA foi observada também na análise de couve.

#### 4.7 - Avaliação das técnicas de CCA e CLAE na análise de carotenóides provitamina A.

Para a avaliação das técnicas de CCA e CLAE na análise de carotenóides provitamina A foram consideradas as metodologias analíticas descritas neste trabalho, com todas as modificações introduzidas. Assim, evitando o passo de saponificação com a utilização da minicoluna, a técnica de CLAE apresentou uma velocidade muito boa, podendo ser executada em um período de uma hora, considerando que se tenha prontas as curvas de calibração, enquanto que a técnica de CCA, mesmo não considerando o passo da saponificação, demora no mínimo o dobro deste tempo.

A exatidão de ambas as técnicas, quando cuidadosamente realizadas, pode ser considerada boa, com alguma vantagem para a CLAE pela menor exposição dos pigmentos à luz e ao oxigênio. Na CCA a exatidão pode, em alguns casos, ser comprometida pela presença de isômeros do  $\beta$ -caroteno, causando uma potenciação do valor vitamínico calculado, enquanto que neste estudo, pela separação apenas parcial dos isômeros cis do  $\beta$ -caroteno e em con-

AMOSTRA	$\alpha$ -caroteno (mg/100 g)*			$\beta$ -caroteno (mg/100 g)*			$\beta$ -criptoxantina (mg/100 g)*			Vitamina A (U.I./100 g)*		
	CLAE		CCA	CLAE		CCA	CLAE		CCA	CLAE		CCA
	Padrão interno	Padrão externo	E 1% 1cm	Padrão interno	Padrão externo	E 1% 1cm	Padrão interno	Padrão externo	E 1% 1cm	Padrão interno	Padrão externo	E 1% 1cm
Cenoura	3,91 (0,13)	3,93 (0,41)	4,01 (0,30)	5,16 (0,04)	5,36 (0,02)	3,73 (0,16)	-	-	-	11854 (6)	12199 (306)	9553 (18)
Mamão	-	-	-	0,19 (0,01)	0,22 (0,03)	0,24 (0,03)	0,66 (0)	0,72 (0,06)	0,68 (0,05)	963 (88)	967 (94)	858 (12)
Azeite de Dendê	6,00 (0)	7,10 (0,18)	1,41 (0,62)	9,25 (0,21)	9,91 (0,10)	17,93 (0,75)	-	-	-	20417 (354)	22433 (12)	31058 (212)
Couve	-	-	-	3,11 (0,12)	3,45 (0,13)	4,67 (0,13)	-	-	-	5174 (201)	5742 (224)	7783 (212)
Tomate	-	-	-	0,80 (0,09)	0,86 (0,11)	0,65 (0,11)	-	-	-	1333 (141)	1433 (189)	1075 (177)

\* Média de duas repetições analíticas (desvio padrão)

Tabela 6. Resultados analíticos das amostras estudadas, obtidos a partir de CCA e CLAE com padronização externa e interna e interna (Sudan I).

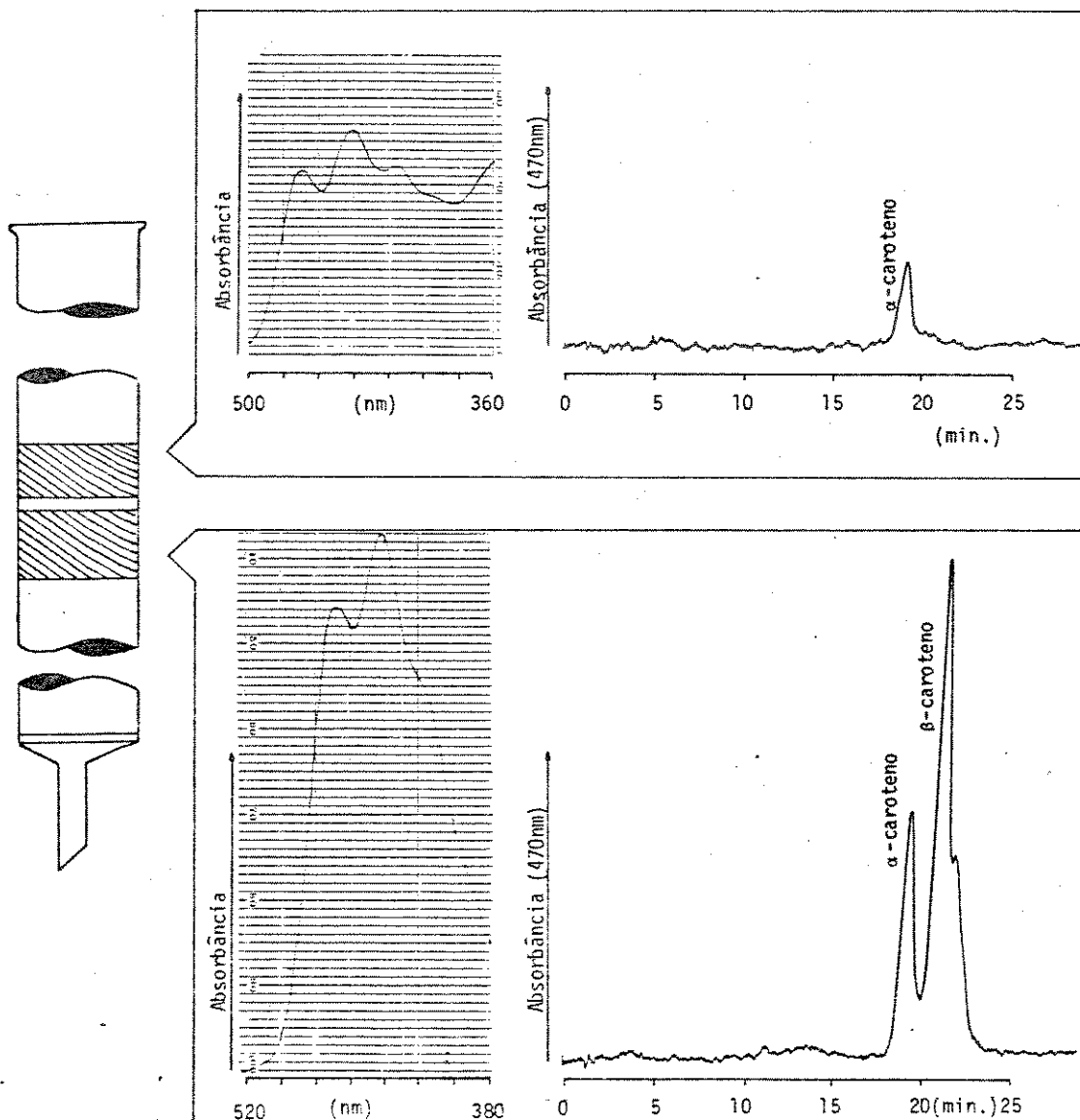


Figura 16. Separação parcial de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno em CCA, espectros de absorção e cromatogramas (CLAE) das frações separadas de um extrato de azeite de dendê. As condições para CLAE estão no texto (seção 3.5.2 b).

sequência sua não participação no resultado final, a CLAE apresenta resultados inferiores aos reais.

A precisão da CCA é muito dependente da experiência do analista neste tipo de separação. A reprodutibilidade do recheio da coluna, da vazão da fase móvel, do momento certo de trocar a polaridade do solvente, entre outros, são funções diretas da qualidade do analista e são reproduzidas no resultado final.

Cabe aqui ressaltar a importância da amostragem na precisão deste tipo de análise, onde muitas vezes a homogeneização incorreta da amostra pode ocasionar resultados diferentes.

As sensibilidades de ambas as técnicas são muito boas, com alguma vantagem para a CCA. Isto se deve ao sistema de detecção utilizado, onde se tem em mãos todo o espectro do carotenóide e se pode tomar o comprimento de onda de maior absorção para o cálculo da concentração. Na CLAE o comprimento de onda usado é fixo durante uma dada análise e pode não representar o máximo de absorção de todos os carotenóides provitamina A estudados.

A avaliação da simplicidade de ambas as técnicas fica por conta da separação dos pigmentos, onde a automação dos sistemas de CLAE, para a análise de rotina, simplifica muito esta operação. Isto não acontece na CCA onde a resolução dos pigmentos é visual, exigindo muita atenção do analista.

A resolução dos carotenóides provitamina A na CLAE é boa, com a separação de isômeros ficando na dependência da qualidade da coluna utilizada. Já a coluna usada neste estudo para a CCA não separa estereoisômeros, sendo necessário uma nova eluição em outro tipo de fase estacionária (geralmente óxido de alumínio



ou hidróxido de cálcio) para tal fim.

Na avaliação de custos para a comparação de ambas as técnicas, foram considerados os seguintes aspectos: (a) investimento, que corresponde à aquisição de equipamentos e vidrarias necessárias para a execução das análises; (b) custos fixos, representado pelo salário da mão de obra necessária e os encargos envolvidos e (c) custo variável, que é dado pelo custo dos solventes e reagentes utilizados além de outros custos operacionais como: energia elétrica, manutenção, etc.

Para o item investimento (a) foi considerado uma vida útil de 10 anos para os equipamentos, e de 1 ano para as vidrarias (reposição total) e colunas cromatográficas. Como custo fixo foi considerado em ambos os casos (CCA e CLAE) um salário médio de mercado para um químico. O período de trabalho foi de um turno (8 horas/dia) e 300 dia por ano.

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentados os valores para cada técnica estudada e a comparação entre ambas. Observa-se que, apesar do custo da CLAE ser aproximadamente 30% maior que a CCA, o volume de análise duas vezes maior para o primeiro (8 análises/dia para CLAE contra 4 análises/dia para CCA) representa, quando a demanda de análise é a máxima, uma vantagem para o sistema CLAE, com o retorno de investimento adicional em aproximadamente dois anos e meio. Esta vantagem de custo persiste para uma demanda de até 5 análises por dia. Quando a demanda de análises é igual ou inferior a 4 análises por dia, os custos tornam a CCA, financeiramente vantajosa.

VALORES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

I INVESTIMENTO

a) Equipamentos (cromatografo líquido com sistema isocrático e detector UV/visível espectrofotômetro; registrador; balanças, micro triturador e bomba de vácuo)..... 181.000 : 10 (anos) : 300 (dias úteis)...

b) Vidrarias ..... 690 x 8 (análises dia) ..... 5.520 : 300 (dias úteis).....

c) Colunas cromatográficas ..... 3.540 : 300 (dias úteis)..... 190.060

II CUSTO FIXO

a) Mão de obra e encargos ..... 2.135 : 30 (dias/mes).....

III CUSTO VARIÁVEL

a) Reagentes solventes e outros ..... 12 x 8 (análises/dia).....

ANÁLISES/DIA

	6	7	8	9	10	11	12
a) Equipamentos (cromatografo líquido com sistema isocrático e detector UV/visível espectrofotômetro; registrador; balanças, micro triturador e bomba de vácuo)..... 181.000 : 10 (anos) : 300 (dias úteis)...	60,33	60,33	60,33	60,33	60,33	60,33	60,33
b) Vidrarias ..... 690 x 8 (análises dia) ..... 5.520 : 300 (dias úteis).....	18,40	16,10	13,80	11,50	9,20	6,90	4,60
c) Colunas cromatográficas ..... 3.540 : 300 (dias úteis)..... 190.060	11,80	11,80	11,80	11,80	11,80	11,80	11,80
II CUSTO FIXO							
a) Mão de obra e encargos ..... 2.135 : 30 (dias/mes).....	71,17	71,17	71,17	71,17	71,17	71,17	71,17
III CUSTO VARIÁVEL							
a) Reagentes solventes e outros ..... 12 x 8 (análises/dia).....	96,00	84,00	72,00	60,00	48,00	36,00	24,00
	257,70	243,40	229,10	214,80	200,50	186,20	171,90
							157,60

VALORES PARA CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA

I INVESTIMENTO

a) Equipamentos (espectrofotômetro; registrador; balanças; micro triturador e bombas de vácuo)..... 81.000 : 10 (anos) : 300 (dias úteis)...

b) Vidrarias ..... 690 x 4 (análises dia)..... 2.760 : 300 (dias úteis)..... 83.760

II CUSTO FIXO

a) Mão de obra e encargos ..... 2.135 : 30 (dias/mes).....

III CUSTO VARIÁVEL

a) Reagentes solventes e outros ..... 22 x 4 (análises/dia).....

Tabela 7. Valores observados (BTN) para as técnicas de CLAE e CCA nas análises de carotenóides provitamina A em alimentos.

COMPARAÇÃO DE CUSTOS

(CLAE)		
<u>CUSTOS/DIA</u>	<u>ANÁLISES/DIA</u>	<u>CUSTOS/ANÁLISE</u>
257,70	8	32,21
243,40	7	34,77
229,10	6	38,18
214,80	5	42,96
200,50	4	50,13
186,20	3	62,07
171,90	2	85,95
157,60	1	157,60

<u>ANÁLISES/DIA</u>	<u>CCA</u>	<u>CLAE</u>
8	45,46	> 32,21
7	48,49	> 34,77
6	52,52	> 38,18
5	58,17	> 42,96
4	48,84	< 50,13
3	57,02	< 62,07
2	73,38	< 85,95
1	122,47	< 157,60

(CCA)		
<u>CUSTOS/DIA</u>	<u>ANÁLISES/DIA</u>	<u>CUSTOS/ANÁLISE</u>
363,74	8	45,46
339,44	7	48,49
315,14	6	52,52
290,84	5	58,17
195,37	4	48,84
171,07	3	57,02
146,77	2	73,38
122,47	1	122,47

Tabela 8. Comparação de custos entre CLAE e CCA na análise de carotenóides pro-vitamina A em alimentos.

## 5 - CONCLUSÃO.

Observou-se neste estudo, que o uso de um sistema de CLAE simples e isocrático, aliado à CCA, permite a separação e identificação dos carotenóides provitamínicos, mostrando-se como um excelente instrumento na análise de rotina destes pigmentos, principalmente com a utilização de padronização interna, que torna o problema apresentado pela dificuldade de se obter padrões analíticos puros e estáveis.

Observou-se ainda, que a separação de estereoisômeros pode ser possível com a metodologia apresentada, necessitando apenas de colunas eficientes para isso.

Por outro lado, apesar da melhor performance da CLAE na análise de rotina destes pigmentos, a CCA apresenta-se como um grande instrumento para a padronização da CLAE, além de ser uma excelente alternativa para a confirmação da identidade de carotenóides.

Portanto, torna-se claro que com as inovações tecnológicas, onde é evidente o aparecimento de colunas cromatográficas mais eficientes e econômicas, a CLAE tornará a melhor opção para a análise de carotenóides provitamínicos e a partir do momento em que detetores como o "Diode Array" tornarem-se acessíveis à grande parte dos trabalhadores da área, esta técnica se afirmará de vez como o melhor meio para o estudo destes pigmentos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 01 - ANDERSON, D.G. & PORTER, J.W. (1962). The biosynthesis of phytoene and other carotenenes by enzymes of isolated higher plant plastids. Arch. Biochem. Biophys. 97: 509 - 519.
- 02 - AOAC (1984). Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, U.A., pp. 834 - 835.
- 03 - ARIMA, H.K. (1987). Composição de carotenóides de curcubitáceas brasileiras. Tese de Mestrado. Unicamp. Campinas, p.185.
- 04 - ARIMA, H.K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1988). Carotenóide composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. J. Micronutr. Anal. 4: 177 - 191.
- 05 - BARANYAI, M.; MATUS, Z. & SZABOLCS, J. (1982). Determination by HPLC, of carotenoids in paprika products. Acta Aliment. 11: 309 - 323.
- 06 - BAUERNFEIND, J.C. (1972) Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. J. Agric. Food Chem., 20: 456 - 473.

- 07 - BICKOFF, E.M.; ATKINS, M.E.; BARLEY, G.F. & STIFF, F.  
(1949). Stereoisomeric analysis of  $\beta$ -carotene. J. Assoc.  
Off. Anal. Chem. 32: 766 - 774.
- 08 - BRAUMAN, J. & GRIMME, L.H. (1981). Reversed-phase high per-  
formance liquid chromatography of chlorophylls and caro-  
tenoids. Biochim. Biophys. Acta. 637: 8 - 17.
- 09 - BRITTON, G. (1988) Biosynthesis of carotenoids. In: Plant  
Pigments, GOODWIN, T.W. (Ed.) Academic Press Ltd. London  
& New York. pp. 133 - 182.
- 10 - BRUBACHER, G.; MULLER-MULOT, W. & SOUTHGATE, D.A.T. (1986).  
Methods for determination of vitamins in foods, Elsevier  
Applied Science Publishers, London & New York, pp. 33 -  
50.
- 11 - BUSHWAY, R.J. (1985). Separation of carotenoids in fruits  
and vegetables by high performance liquid chromatography.  
J. Liq. Chromatogr. 8: 1527 - 1547.
- 12 - BUSHWAY, R.J. & WILSON, A.M. (1982). Determination of  $\alpha$  and  
 $\beta$ -carotene in fruit and vegetables by high performance  
liquid chromatography. Can. Inst. Food Sci. Technol. J.  
15: 165 - 169.

- 13 - BUREAU, J.L. & BUSHWAY, R.J. (1986). HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. *J. Food Sci.* 51: 128 - 130.
- 14 - CECCHI, H.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1981a). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale*, L.) juice. *J. Food Sci.*, 46: 147 - 149.
- 15 - CECCHI, H.M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1981b). Carotenoides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. *Ciênc. Cult.* 33: 72 - 76.
- 16 - CHICHESTER, C.O. & MC FEETERS, R. (1971). Pigment degeneration during processing and storage. In: *The biochemistry of fruits and their products*. HULME, A.C. (Ed.), Academic Press, London. Vol. 2, p. 107.
- 17 - COLDITZ, G.A.; BRANCH, L.G.; LIPNICK, R.J.; WILLET, W.C.; ROSNER, B.; ROSNER, B.M. & HENNEKENS, C.H. (1985). Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer death in an elderly population, *J. Am. Clin. Nutr.*, 41: 32 - 36.
- 18 - DAVIES, B.H. (1976). Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed. Vol. 2, GOODWIN, T.W. (Ed.) Academic Press, London & New York, pp. 38 - 65.

- 19 - DEUEL JR., H.J.; JOHNSTON, C.; MESERVE, E.R.; POLGAR, A. & ZECHMEISTER, L. (1945). Stereochemical configuration and pro vitamin A activity IV. Neo- $\beta$ -carotene B and neo- $\beta$ -carotene B, Arch. Biochem. 7: 247 - 255.
- 20 - DEUEL JR., H.J.; JOHNSTON, C.; SUMNER, E.; POLGAR, A. & ZECHMEISTER, L. (1944). Stereochemical configurations and provitamin A activity. I. All-trans- $\beta$ -carotene and neo- $\beta$ -carotene U. Arch. Biochem. 5: 107 -114.
- 21 - EDWARDS, C.G. & LEE, C.Y. (1986). Measurement of provitamin A carotenoids in fresh and canned carrots and green peas. J. Food Sci. 51: 534 - 535.
- 22 - FERREIRA, F.A.G. (1983). Nutrição Humana, Fundação Calouste Gulbekian (Ed.), Lisboa, p. 1291.
- 23 - GEBHARDT, S.E.; ELKINS, E.R. & HUMPHREY, J. (1977). Comparison of two methods for determining the vitamin A value of clingstone peaches. J. Agric. Food. Chem. 25: 629 - 632.
- 24 - GILLAN, F T. & JOHNS, R.B. (1983). Normal-phase HPLC analysis of microbial carotenoids and neutral lipids. J. Chromatogr. Sci. 21: 34 - 38.



- 25 - GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1987). Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (Mangifera indica) slices and puree. Int. J. Food Sci. Technol. 22: 451 - 460.
- 26 - GODOY, H.T. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1989). Carotenoid Composition of commercial mangoes from Brasil. Lebensm. Wiss. Technol. 22: 100 - 103.
- 27 - GOODWIN, T.W. (1980). Nature and Properties. In. The Biochemistry of the carotenoids, Vol.I, GOODWIN T.W. (Ed.), Chapman and Hall, London & New York, pp. 1 - 32.
- 28 - GREGORY, K.G.; CHEN, T.S. & PHILIP, T. (1987). Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruit by HPLC: red bell peppers, J. Food Sci. 52: 1071 - 1073.
- 29 - HAJIBRAHIM, S.K.; TIBBETS, P.J.C.; WATTS, C.D.; MAXWELL, J.R. & EGLINTON, G. (1978). Analysis of carotenoid and porphyrin pigments of geochemical interest by high-performance liquid chromatography. Anal. Chem. 50 : 549 - 553.
- 30 - HSIEH, Y.P.C. & KAREL, M. (1983). Rapid extraction and determination of  $\alpha$  and  $\beta$ -carotene in foods. J. Chromatogr. 259: 515 - 518.

- 31 - IUPAC (1971) Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry*, 10, 4827.
- 32 - JOHNSON, R.M. & BAUMANN, C.A. (1947). Storage and distribution of vitamin A in rats fed certain isomers of carotene. *Arch. Biochem.* 14: 361 - 367.
- 33 - KHACIK, F. BEECHER, G. R. (1985). Decapreno  $\beta$ -caroteno as an internal standard for the quantification of the hydrocarbon carotenoids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 346: 237 - 246.
- 34 - KHACIK, F.; BEECHER, G.R. & WHITAKER, N.F. (1986). Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 603 - 616.
- 35 - KIMURA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1987). Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. Cited in RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1989). Critical Review of Provitamin A. Determination in Plant Foods. *J. Micronutr. Anal.* 5: 191 - 225.
- 36 - LAMBERT, W.E.; NELIS, H.J.; DE RUYTER, M.G.M. & DE LEENHEER, A.P. (1985). Vitamin A: Retinol, Carotenoids and related

compounds. In: Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins. DE LEENHEER, A.P.; LAMBERT, W.E. & DE RUYTER, M.G.M. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York & Basel.

- 37 - LEE, C.Y. (1986). Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. Food Chem. 20: 285 - 293.
- 38 - LEE, C.Y.; MC COON, P.E. & LEBOWITZ, J.M. (1981). Vitamin A value of sweet corn. J. Agric. Food Chem. 29 : 1294 - 1295.
- 39 - LEE, C.Y.; SMITH, N.L. & ROBINSON, R.W. (1984). Carotenoids and vitamin A value of fresh and canned winter squashes. Nutr. Rep. Int. 29: 129 - 133.
- 40 - MATHEWS-ROTH, M.M. (1985). Carotenoids and cancer preventions - experimental and epidemiological studies, Pure Appl. Chem., 57: 717 - 722.
- 41 - NAS - NRC. (1980). Recommended Dietary Allowances, National Academy of Sciences - National Research Council, Washington, DC, 9th ed.
- 42 - NOGA, G. & LENZ, F. (1983). Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Chromatographia. 17: 139 - 142.

- 43 - OGUNLESI, A.T. & LEE, C.Y. (1979). Effect of processing on the stereoisomerization of major carotenoids and vitamin A value of carrots. Food Chem. 4: 311 - 318.
- 44 - OLSON, J.A. (1989). Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$  - carotene into vitamin A. J. Nutr. 119: 105 - 108.
- 45 - OLSON, J.A. & LAKSHMANAN, M.R. (1970). Enzymatic transformation of vitamin A; with particular emphasis on carotenoids cleavage. In. The fat-soluble vitamins. DELUCA H.F. & SUTTIE, J.W. (Eds.), Madison, University of Wisconsin Press, pp. 213 - 226.
- 46 - PADULA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & MORAES, M.A.C. (1983). Comparison of the carotenoid composition and general properties of the processed juice of guava IAC-4 and commercial juice. Cienc. Tecnol. Aliment. 3: 109 - 116.
- 47 - PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1986). Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (Psidium guajava L.) Food Chem. 20: 11 - 19.
- 48 - PADULA, M. & RODRIGUEZ - AMAYA, D.B. (1987). Changes the individual carotenoids and vitamin C on processing and sto-

rage of guava juice. Acta Aliment. 16: 209 - 216.

- 49 - QUACKENBUSH, F.W. & SMALLIDGE, R.L. (1986). Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic system for separation and quantification of provitamins A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 767 - 772.
- 50 - REEDER, S.K. & PARK, G.L. (1975). A specific method for determination of provitamin A carotenoids in orange juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58: 595 - 598.
- 51 - RITTER, E. & PURCELL, A.E. (1981). Carotenoid analytical methods. In. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, BAUERNFEIND, J.E. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 815 - 923.
- 52 - ROBERTS, L.J. (1981). Nutricion, Editorial Universitaria, Puerto Rico, p.443.
- 53 - RODRIGUEZ D.B., RAIMUNDO, L.C., LEE, T.C., SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. (1976 a). Carotenoid pigment changes in ripening Momordica charantia fruits. Ann. Bot. 40: 615 - 624.
- 54 - RODRIGUEZ, D.B.; TANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON, K.L.; LEI, T.C. & CHICHESTER, C.O. (1976 b). Hydroxylation of  $\beta$ -carotene on microcel C. J. Agric. Food Chem., 24: 819 - 822.

- 55 - RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1989). Critical Review of Provitamin A Determination in Plant Foods. *J. Micronutr. Anal.* 5: 191 - 225.
- 56 - RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; BOBBIO, P.A. & BOBBIO, F.D. (1983). Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit Cyphomandra betacea. *Food Chem.* 12: 61 - 65.
- 57 - RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. (1988). Assessment of provitamin A determination by open column chromatography - visible absorption spectrophotometry. *J. Chromatogr. Sci.* 26: 624 - 629.
- 58 - RUEDI, P. (1985). HPLC a powerful tool in carotenoid research. *Pure Appl. Chem.* 57: 793 - 800.
- 59 - SIMPSON, K.L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 7 - 17.
- 60 - SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.* 1: 351 - 374.
- 61 - SIMPSON, K.L.; TSON, S.C.S. & CHICHESTER, C.O. (1985). *Methods of Vitamin Assay*, 4th Ed., Wiley, New York, pp. 185 - 220.

- 62 - SISTAK, Z. (1980) Paper chromatography of chloroplast pigments (chlorophylls and carotenoids). *Photosynthetica*, 14: 239.
- 63 - STEWART, I. (1977a). High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 132 - 136.
- 64 - STEWART, I. (1977b). Provitamin A and carotenoid content of citrus juice. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1132 - 1137.
- 65 - STRAIN, H.H.; SHERMA, J. & GRANDOLFO, M. (1967). Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents. *Anal. Chem.*, 39, 926 - 932.
- 66 - SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. (1970). Separation of carotene stereoisomers in vegetables, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53: 937 - 940.
- 67 - SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. (1971a). Effect of processing on provitamin A in vegetables. *J. Am. Diet Assoc.* 59: 238 - 243.
- 68 - SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. (1971b). Effect of selected herbicides on provitamin A content of vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 19: 854 - 856.

- 69 - SWEENEY, J.P. & MARSH, A.C. (1973). Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J. Nutr.* 103: 20 - 25.
- 70 - TANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON, K.L. & CHICHESTER, C.O. (1981). Stability of carotenoids on silica gel and other adsorbents. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 46: 799.
- 71 - TAYLOR, F.R. (1983). Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv. Chromatogr.*, 22: 157 - 213.
- 72 - THOMPSON, R.N. (1981). Problem of official methods and new techniques for analysis of the foods and feeds for vitamin A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 727 - 738.
- 73 - TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; TAKII, T. & KOYAMA, Y. (1982). Separation and determination of cis-trans- $\beta$ -carotenes by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 245: 359 - 364.
- 74 - VECCHI, M.; ENGLERT, G.; MAURER, R. & MEDUNA, V. (1981). Trennung und charakterisierung von  $\beta$ -carotin-isomeren. *Helv. Chim. Acta.* 64: 2746 - 2758.
- 75 - VETTER, W.; ENGLERT, G.; RIGASSI, N. & SCHWIETER, U. (1971). Spectroscopic methods. In: *Carotenoids*, ISLER, O. (Ed.),



Birkhauser Verlag Basel, pp. 189 - 266.

76 - WEEDON, B.C.L. (1971). Occurrence. In: Carotenoids. ISLER, O. (Ed.) Birkhauser Verlag, Basel, pp 29 - 62.

77 - WILL III, O.H. & RUDDAT, M. (1984). C18 reversed-phase HPLC analysis of carotenes. L. C. Mag. 2: 610 - 612.

78 - ZAKARIA, M.; SIMPSON, K.L.; BROWN, P.R. & KRSTULOVIC, A. (1979). Use on reversed-phase, high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. J. Chromatogr. 176: 109 - 117.