

NOVA TÉCNICA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO β -CAROTENO EM MATERIAL VERDE (a)

A NEW TECHNIQUE FOR THE EXTRACTION AND DETERMINATION OF β -CAROTENE IN GREEN STUFF

WALDOMIRO PREGNOLATTO (b)

FRANCISCO PEDUTI (b)

SUMMARY

A technique has been developed for the extraction and determination of β -carotene from vegetables and all naturally green stuff. The extraction of the pigments is done in a modified Soxhlet in such a way that one is able to extract at the same time all the pigments and to separate the chlorophyll from the yellow pigments. In the present technique the formation of emulsions is prevented, time is spared and one is able to completely extract all the β -carotene present in the stuff. The β -carotene is chromatographically separated from the other pigments, after the extraction and separation of the chlorophyll, by a modified Quackenbush *et alii* technique.

INTRODUÇÃO

Ainda hoje os métodos de dosagem do β -caroteno pouco diferem daquele preconizado por KUHN & BROCKMAN¹, com a diferença de que agora dispomos de espectrofotômetros sensíveis para medição da absorção das suas soluções. Aquêles autores mediam, todavia, simplesmente a intensidade de uma solução alaranjada, computando tudo como β -caroteno. À luz dos atuais conhecimentos, obtinham êles sempre valores muito elevados para a pró-vitamina A. Com as observações feitas por DEUEL *et alii*², em 1945, e KEMERER *et alii*³, em 1955, de que a atividade vitamínica do γ -caroteno e do α -caroteno eram bem inferiores à do β -caroteno, a separação dessas substâncias tornou-se necessária para uma melhor avaliação do poder vitamínico A de um vegetal.

BEADLE & ZSCHERLE⁴ descobriram posteriormente estério-isômeros do β -caroteno em vários vegetais, isômeros

êsses sem atividade vitamínica A. Também a separação desses estério-isômeros se tornou necessária.

A importância da separação dos diferentes pigmentos foi evidenciada por CALLISON *et alii*⁵ que, determinando química e biologicamente o β -caroteno da cenoura e da batata-doce, mostraram que pelo método biológico se determinava apenas 34 a 41% do β -caroteno encontrado pelo método químico.

Para nós, constituiu sempre, um sério problema a extração e separação do β -caroteno, existente na parte verde dos vegetais em geral, dos outros carotenóides, pigmentos e clorofila. Experimentamos diferentes métodos de extração, como sejam o preconizado por COOLEY e KOEHN⁶, que refluxavam o material durante uma hora com partes iguais de tolueno, álcool etílico e acetato de etilo, ou aquêles recomendados pelo A.O.A.C.⁷

(a) Trabalho realizado na Secção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado na 15.^a Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

(refluxar alfafa com acetona a 30% em Skellysolve B ou refluxar o material em solução alcoólica de KOH a 12%⁸), sem que nenhum deles nos satisfizesse, pois verificamos que sempre grande parte do β -caroteno continuava incluído na clorofila.

Efetuamos, então, uma série de experiências pelas quais chegamos à elaboração de um método de extração do β -caroteno existente em vegetais, principalmente aquele existente na sua parte verde.

MATERIAL E METODOS

Preparo do material — Secar o material a vácuo e à temperatura máxima de 45°C e pulverizá-lo com o auxílio de um moinho a martelo.

Técnica da extração — Colocar meia grama do material verde desidratado e reduzido a pó fino em um pequeno cartucho de extração (Soxlet), sobrepondo-se ao pó um pequeno tampão de algodão.

Colocar o cartucho em um extrator contínuo, tipo Soxlet, com cerca de 250 cm³ de capacidade. Adicionar ao balão do extrator 8 a 10 pastilhas de hidróxido de sódio puro.

Extraír o material com éter etílico purificado, isento de peróxidos, de água e de álcool, durante 6 a 8 horas, para que todo o material seja extraído. A vantagem de se usar o éter etílico como solvente é a de que êle dissolve perfeitamente os pigmentos do material verde, pigmentos êsses que se acham interligados na composição do produto. O éter etílico, arrastando os pigmentos e a clorofila do vegetal, põe esta última em contacto com a pequeníssima quantidade de hidróxido de sódio que está dissolvido no éter, tornando-a insolúvel. O excesso de hidróxido de sódio, adicionado, tem a função de reter a água ainda existente no material verde submetido à extração.

Após 8 horas, suspender a extração. Reduzir o volume do solvente até 40 cm³, evaporando o éter em atmosfera de nitrogênio.

Transferir a solução final para um cartucho, agora longo, de um nôvo Soxlet contínuo. Lavar bem com éter. Fechar

com tampão de algodão. Adicionar éter até atingir cerca de 2/3 do volume do balão, que deverá ter a capacidade de 250 cm³.

Extraír, agora continuamente, durante duas horas, o que determina a separação de todo o β -caroteno da clorofila que fica retida no cartucho. Evaporar totalmente o éter em atmosfera de nitrogênio e diluir o resíduo com 100 cm³ de hexana.

Cromatografia — Adotamos para a separação cromatográfica dos diferentes pigmentos amarelos existentes no material verde a técnica descrita por QUACKENBUSH *et alii*⁹, com ligeiras modificações:

Cromatografar 25 cm³ da solução hexânica através de uma coluna de magnésia (12 x 1 cm), à qual é sobreposta, por segurança, uma camada de 1 cm de altura de sulfato de sódio anidro.

Eliminar o dissolvente a vácuo e eluir inicialmente com hexana contendo 5% de acetona, obtendo-se assim a fração 1 de Quackenbush, com a qual todo o β -caroteno é extraído. Eliminar o dissolvente em atmosfera de nitrogênio, a abrigo da luz.

Diluir o resíduo com 100 cm³ de éter de petróleo (60 a 80°C).

Determinar a absorção em espectrofotômetro, a 450 m μ (utilizamos o espectrofotômetro Beckman DU).

Determinar a concentração de β -caroteno em microgramas por grama de material, pela fórmula:

$$C = \frac{AVD \times 1000}{aP}$$

A = absorvência
V = volume original do extrato
D = fator de diluição
P = peso da amostra
a = fator de absorção

RESULTADOS

Testamos a técnica descrita, determinando o teor de β -caroteno existente no espinafre (*Spinacia oleracea*) e nas folhas de cenoura (*Daucus carota*) comparativamente à técnica do A.O.A.C., conforme o demonstra o quadro:

Teores de β -caroteno encontrados pela técnica descrita e pela técnica da A.O.A.C.

Material	Técnica descritiva		Técnica da A.O.A.C.	Literatura
	β -caroteno $\mu\text{g/g}$	outros carotenóides $\mu\text{g/g}$	β -caroteno $\mu\text{g/g}$	β -caroteno $\mu\text{g/g}$
Espinafre fresco	42,5	7,5	22,0	63,0 (4) 43,0 — 120,0 (10)
Fóllhas de cenoura	39,6	6,6	20,0	—

CONCLUSÕES

A técnica que desenvolvemos permite eliminar o grande número de lavagens em dupla-fase (água-dissolvente orgânico) necessárias para se obter a completa eliminação da clorofila saponificada; evita-se, assim, a formação de emulsões quase sempre desagradáveis. Além disso, permite trabalhar-se com pequena quantidade de material em tempo menor, extrair todo o β -caroteno existente no material em exame e os resultados são reproduzíveis. Aplicando o método em questão, estamos procedendo à determinação do teor de β -caroteno em vegetais, frutas e outros materiais verdes do Brasil, o que será objeto de trabalho ulterior.

RESUMO

Os autores descrevem uma nova técnica para extrair e dosar β -caroteno de vegetais e material verde em geral.

A extração dos pigmentos é feita em aparelho de Soxlet modificado de maneira a permitir a extração de todos os pigmentos e a separação de toda a clorofila dos mesmos. Após a extração da clorofila, o β -caroteno é separado cromatograficamente dos outros pigmentos amarelos e determinado espectrofotometricamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUHN, R. & BROCKMANN, H. — Determination of carotenoids. Z. Physiol. Chem. 206:41-64, 1932.
2. DEUEL, J., Jr. *et alii* — Stereo-chemical configuration and provitamin A activity. III. All-trans- β -carotene and neo- β -carotene U. Arch. Biochem. 6: 157-161, 1945.
3. KEMMERER, A. R. & FRAPS, G. S. — The vitamin activity of neo- β -carotene U and its steric rearrangement in the digestive tract of rats. J. Biol. Chem. 161:305-309, 1945.
4. BEADLE, B. W. & ZSCHEILE, F. P. — Studies on the carotenoids. II. The isomerization of β -carotene and its relation to carotene analysis. J. Biol. Chem. 144:21-33, 1942.
5. CALLISON, E. C. *et alii* — Comparison of chemical analysis and bio-assay as measures of vitamin A value of some vegetables and the effect of comminution upon the bio-assay value. J. Nutrition 37(1):139-152, 1949.
6. COOLEY, M. L. & KOEHN, R. C. — Chromatographic estimation of carotene in feeds and feed ingredients. Anal. Chem. 22:322-326, 1950.
7. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEM. — Changes in official and tentative methods of analysis made at the Sixty-first-Annual Meeting, 1947. 36. Vitamins. J. Assoc. Agric. Chem. 31:111-112, 1948.
8. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEM. — Changes in official and tentative methods of analysis made at Sixtieth-first-Annual Meeting, 1946. 36. Vitamins: carotene. J. Assoc. Agric. Chem. 30: 84-86, 1947.
9. QUACKENBUSH, F. W. *et alii* — Analysis of carotenoids in corn grain. J. Agric. & Food Chem. 9(2):132-135, 1961.
10. U. S. DEPT. AGRIC. — Food: The Yearbook of Agriculture. Washington, D. C., Govt. Print. Off., 1959. p. 238.

