

RETENÇÃO DE CAROTENOIDES DURANTE ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO AMOSTRADOR AUTOMÁTICO COM SISTEMA DE REFRIGERAÇÃO

Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro⁽¹⁾, Maria Cristina Dias Paes⁽¹⁾, Carlos Henrique de Paula Pires⁽¹⁾, Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães⁽¹⁾ e Robert Eugene Schaffert⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, pauloedu@cnpmc.embrapa.br

Resumo – Foi adquirido e instalado um sistema de refrigeração para acoplamento ao amostrador automático do cromatógrafo líquido de alta eficiência, com o objetivo de manter as amostras refrigeradas durante períodos maiores após sua reconstituição, possibilitando, assim, aumentar a capacidade diária de análises sem perda de qualidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência desse novo sistema na manutenção das concentrações de carotenoides de amostras de milho durante o ciclo de um dia de análises. O sistema foi eficiente na retenção desses compostos. O uso do sistema refrigerado mostrou-se indispensável na análise de amostras reconstituídas em solventes muito voláteis.

Palavras-chave: retenção de carotenoides, *Zea mays*, cromatografia líquida de alta eficiência

Abstract – It was purchased and installed a cooling system for the coupling of high performance liquid chromatograph autosampler, aiming to keep the samples refrigerated for longer periods after reconstitution, thus enabling to increase the daily capacity of analysis without loss of quality. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of this new system in maintaining the concentrations of carotenoids in corn samples during the course of a day of analysis. The system was efficient in the retention of these compounds. The use of cooling system proved to be indispensable in the analysis of samples reconstituted in very volatile solvents.

Keywords: retention of carotenoids, *Zea mays*, high performance liquid chromatography

Introdução

O milho (*Zea mays*) é uma das principais fontes de carotenoides na alimentação humana. Como precursores da vitamina A, alguns desses pigmentos são responsáveis pela prevenção da hipovitaminose A (Rios et al., 2008). Uma das formas de garantir a ingestão dessas substâncias pela população é a biofortificação de alimentos, que é o aumento nos teores de nutrientes essenciais em alimentos que normalmente já fazem parte da dieta da população (Nutti et al., 2010). Para o sucesso de um programa de biofortificação por meio de melhoramento genético, é fundamental que as análises químicas possuam logística e qualidade técnica adequadas para processamento de um grande número de amostras.

Considerando as características do processo de extração dos carotenoides e as condições cromatográficas, a capacidade inicial do Laboratório de Agroquímica da Embrapa Milho e Sorgo para análises de carotenoides por CLAE era de 8 análises por dia. Apesar de possuir um amostrador automático, as análises não eram processadas *overnight* para garantir que não haveria perdas devido à degradação dos carotenoides depois de longos períodos de armazenamento em temperatura ambiente, após reconstituição da amostra. Para evitar esse problema e aumentar a capacidade analítica do equipamento para 34 análises por dia, foi adquirido e instalado um sistema de refrigeração, acoplado

ao amostrador automático, que permite manter a temperatura das amostras a 4 °C enquanto aguardam ser analisadas por períodos maiores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do sistema de refrigeração do amostrador automático na manutenção das concentrações originais de carotenoides em amostras de milho durante um ciclo de análises de 24 horas.

Materiais e Métodos

Análises de carotenoides

O protocolo de extração de carotenoides de milho foi baseado na metodologia de Kurilich e Jovik (1999) modificada.

A reconstituição do extrato de milho para análise por CLAE foi feita em 1000 µL acetona grau HPLC. As análises de carotenoides foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência marca Shimadzu, modelo LC10A, utilizando amostrador automático modelo SIL 10A equipado com sistema de refrigeração modelo Sampler Cooler L, coluna cromatográfica marca Waters, modelo YMC® Carotenoid S-3 com dimensões 4,6 x 250 mm, controlador de sistema modelo CBM 20A. Os solventes envolvidos diretamente nas análises por CLAE foram de grau HPLC e os demais procedimentos de grau P.A. As amostras foram analisadas em sistema gradiente, utilizando misturas dos solventes metanol (A) e éter metil terc-butílico (B), com fluxo constante de 0,80 mL.min⁻¹, iniciando com 80% de A durante 5 min, reduzindo linearmente para 60% em 5 min, em seguida linearmente para 40% em 5 min e linearmente para 20% em 5 min, permanecendo nessa proporção por 5 min. Para retomar as condições iniciais para a análise posterior, a proporção de A foi aumentada linearmente para 80% em 5 min, permanecendo constante durante 9 min, até o final da análise. A temperatura do forno foi de 40 °C, a detecção foi realizada utilizando o comprimento de onda de 450 nm, o loop de amostragem foi de 100 µL e o sistema CLAE foi programado e operado utilizando o software Shimadzu LC Solution. A temperatura do laboratório foi mantida próxima de 21 °C, que será considerada nesse estudo como temperatura ambiente.

Para quantificação dos carotenoides, foram montadas curvas de calibração utilizando padrões obtidos de mistura de padrões extraídos de milho verde (beta-criptoxantina, luteína e zeaxantina) e de cenoura (alfa e beta-carotenos) e purificados por cromatografia preparativa.

As pesagens para determinação da evaporação do solvente foram realizadas em balança Analítica, marca Mettler Toledo, modelo AG 245, com sensibilidade de 0,0001 g.

Testes de estabilidade dos analitos

Para avaliar a eficiência do uso do sistema de refrigeração estabilizado a 4 °C na retenção dos carotenoides no amostrador automático, foram realizadas 12 extrações de uma mesma amostra. Soluções de duas dessas extrações foram analisadas de imediato, para confirmação da presença dos carotenoides a serem avaliados na amostra selecionada. Para eliminar o erro referente à extração, os outros 10 extratos foram combinados para obter uma amostra composta de aproximadamente 10 mL. Essa amostra composta foi dividida em alíquotas, transferida para 10 frascos tipo *vial* e acondicionadas no amostrador automático acoplado a sistema de refrigeração.

As alíquotas foram analisadas de forma sequencial, a cada 42 minutos, intercaladas a cada três análises com um padrão conhecido de beta-caroteno de 0,0500 µg. Ao final das 10 análises, elas foram repetidas. A última amostra foi analisada após 16 h e 40 min da primeira amostra.

Resultados e Discussão

Uma primeira avaliação qualitativa dos cromatogramas nas diferentes temperaturas de teste (amostrador a 4 °C e em temperatura ambiente) demonstrou que, em ambos os casos, não apareceram novos picos na última análise sequencial, quando comparados com a análise no tempo zero (dados não

apresentados), sendo uma primeira indicação da estabilidade dos carotenoides analisados. Assim, no período do teste, tanto a 4 °C quanto em temperatura ambiente, não houve desenvolvimento de novas substâncias detectáveis resultantes da degradação térmica ou fotoquímica dos carotenoides analisados, resultado em parte atribuído à presença de BHT como conservante.

Do ponto de vista quantitativo, verificou-se que, utilizando o sistema de refrigeração do amostrador a 4 °C, obteve-se uma excelente retenção de todos os carotenoides analisados (Figura 1), sendo que a redução média na concentração deles foi de 1,3% ao final do teste, variando de 0,35 a 2,1% dependendo do analito. Para obter esse resultados, foram comparadas as médias das cinco últimas análises, realizadas entre 792 e 1000 minutos, com a média das cinco primeiras análises, realizadas entre 0 e 209 minutos. Com esse procedimento, reduziram-se as pequenas variações ocorridas em função dos erros analíticos de uma corrida para a outra.

Quando os resultados acima foram comparados com os obtidos sem o sistema de refrigeração, observou-se um comportamento inesperado. Em princípio, como tratavam-se de analitos térmica e fotoquimicamente sensíveis, acreditava-se que em temperatura ambiente ocorreria uma considerável redução de suas concentrações ao longo das análises. Entretanto, verificou-se, de um modo geral, aumento na concentração dos carotenoides de 9,5% em média, variando de 5,6 a 12% dependendo do carotenóide (Figura 2). Provavelmente isso ocorreu devido à redução do volume da amostra que, em temperatura ambiente, sofreu volatilização da acetona na qual os carotenoides foram reconstituídos.

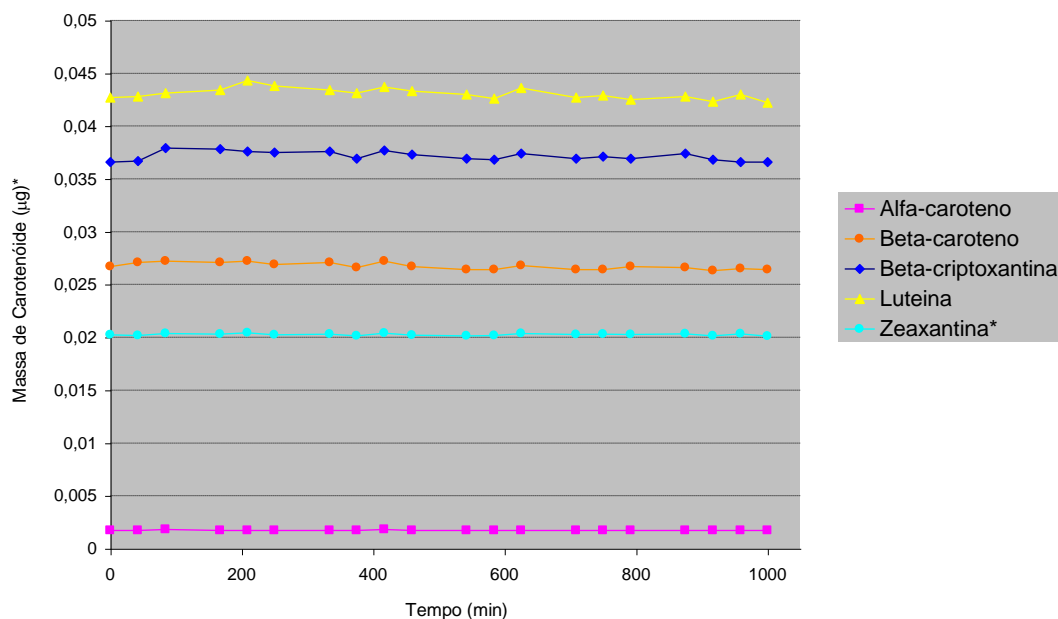


Figura 1. Massa de carotenoides detectada em loop de 100 µL durante análise sequencial de amostra composta em amostrador automático refrigerado a 4 °C.

*Para melhor visualização dos dados no gráfico, a massa detectada de Zeaxantina foi dividida por 10.

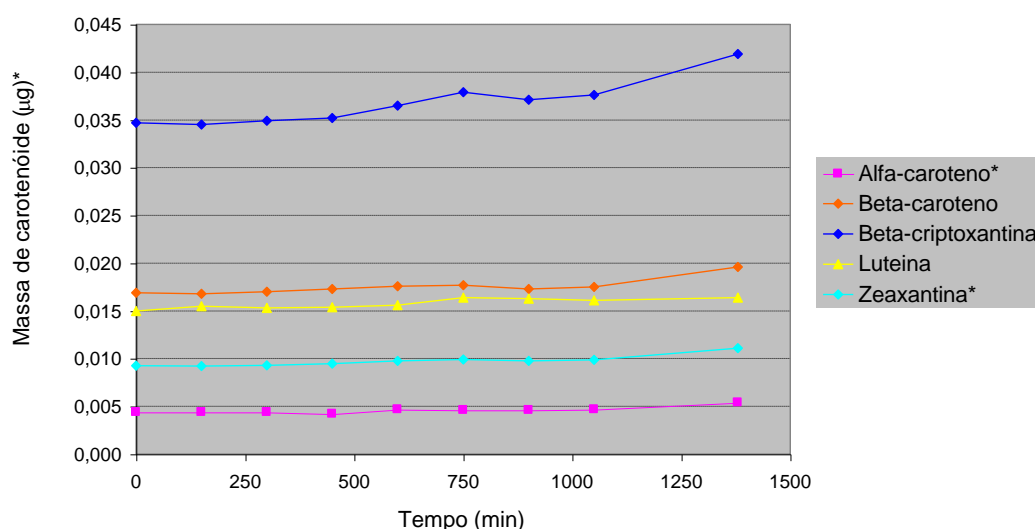


Figura 2. Massa de carotenoides detectada em loop de 100 µL durante análise sequencial de amostra composta em amostrador automático em temperatura ambiente.

*Para melhor visualização dos dados no gráfico, a massa detectada de Alfa-caroteno foi multiplicada por 10 e a de Zeaxantina foi dividida por 10.

Para comprovar essa hipótese, foram realizados testes para quantificar a evaporação de acetona nas condições analíticas, ou seja, passando pelo mesmo processo de armazenamento em vial durante o período em que as amostras ficam no amostrador automático aguardando a análise, com e sem o uso do sistema de refrigeração do amostrador. Os resultados desses testes (Figura 3) mostraram que não houve diferença em iniciar as análises no início da manhã ou no início da tarde, mesmo sem o uso do sistema refrigerado, o que demonstra uma boa estabilidade durante dia e noite na temperatura do Laboratório onde o equipamento está instalado. É bem pronunciada a diferença na perda de massa de acetona por evaporação quando não se usa o sistema de refrigeração do amostrador automático (cerca de 11% após um dia) em comparação com o uso do sistema refrigerado a 4 °C (cerca de 2% após um dia). Essa diferença justifica o aumento médio de 9,5% na massa detectada dos carotenoides quando armazenados e analisados sem o uso do sistema de refrigeração do amostrador automático.

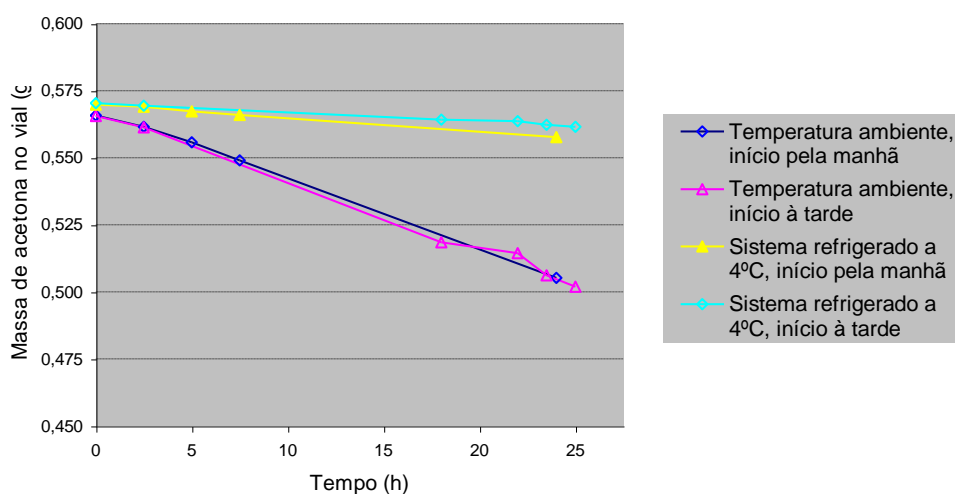


Figura 3. Perda de massa de acetona por evaporação em vial armazenado no amostrador automático.

Conclusões

O uso do sistema de refrigeração do amostrador automático mostrou-se eficiente na conservação das concentrações dos carotenoides analisados por CLAE obtendo-se, após 16 horas e 40 min de reconstituição da amostra, uma redução média de 1,3% na concentração deles, valor aceitável para essas análises. Dessa forma, é possível realizar essa análise 24 h por dia, no que se refere à qualidade de resposta do Cromatógrafo.

.O sistema de refrigeração mostrou-se indispensável quando necessita-se manter uma amostra aguardando para ser analisada via amostrador automático por períodos de tempos maiores (durante a noite, por exemplo), especialmente quando ela for reconstituída em solvente muito volátil, sob pena de haver superestimação das concentrações dos analitos, em função da redução de volume decorrente da evaporação do solvente.

Agradecimentos

Ao Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto pelo apoio financeiro ao projeto BioFORT e ao HarvestPlus.

Referências

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.1948-1955, 1999.

NUTTI, M. R.; WATANABE, E.; CARVALHO, J. L. V. de; SILVA, S. P. da; RAMOS, S. R. R.; NEVES, P. de C. F.; DEL PELOSO, M. J.; ROCHA, M. de M.; SANTOS, V. da S.; SCHAFFERT, R. E.; MELO, W.; SCHEREEN, P. L.; CURADO, F. F. Biofortificação de alimentos para combater a desnutrição no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE INOVAÇÃO E CRIATIVIDADE CIENTÍFICA NA EMBRAPA, 2., 2010, Brasília, DF. Pôsteres. Brasília, DF: Embrapa, 2010.

RIOS, S. A.; PAES, M. C. D.; BORÉM, A.; CRUZ, C. D.; GUIMARAES, P. E. de O.; PIRES, C. H. de P.; CARDOSO, W. S. Adaptabilidade e estabilidade de carotenoides em cultivares de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27. Londrina. Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo - trabalhos e palestras. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.