MUDANÇAS NOS TEORES DE ALFA E BETA CAROTENO EM ÓLEO DE DENDÊ DURANTE O ARMAZENAMENTO A TEMPERATURA AMBIENTE (26°C)*

IVALDO NIDIO SITONIO TRIGUEIRO**
MARILENE DE VUONO CAMARGO PENTEADO***

Com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento na composição dos estereoisômeros e nos teores de alfa e beta caroteno de óleo de dendê bruto, proveniente do Rio Grande do Norte e de óleo de dendê refinado adquirido num supermercado de São Paulo, amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (26°C) durante 90 dias. Com o armazenamento não foram observadas mudanças qualitativas nos estereoisômeros de alfa e beta caroteno. No entanto, ao final do experimento, foram observadas perdas nos totais de alfa e beta caroteno do óleo de dendê bruto (0,51 e 12,70%, respectivamente). O óleo de dendê refinado apresentou perdas de 19,76% e 20,91%, respectivamente no alfa e beta caroteno total. Estas perdas provocaram diminuição dos teores de vitamina A, de 8,53% no óleo bruto e de 17,89% no óleo refinado.

1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides representam o mais amplo grupo de pigmentos que ocorre na natureza. Estão presentes nos tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos como raízes, sementes, frutas e esporadicamente em fungos e bactérias (25).

A atividade vitamínica A dos carotenóides, é de grande importância para os países em desenvolvimento, onde sua deficiência é considerada um dos graves problemas (1, 21, 26). No Nordeste brasileiro foram realizados diversos inquéritos, principalmente

*Parte do trabalho experimental da Tese de Doutorado do primeiro autor.

**Professor Adjunto do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba.

***Professor Associado do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Universidade de São Paulo.

com pré-escolares, tendo sido constatado que naquela região a hipovitaminose A é um problema de saúde pública, tendo se tornado tão grave a ponto de ter sido necessária intervenção através da utilização de doses maciças de vitamina A, em forma de medicamento àquela população (7, 11, 23, 24).

Os carotenóides desempenham papel de fundamental importância na nutrição, pois são precursores de vitamina A. Dos cerca de 500 carotenóides conhecidos apenas 10% apresentam atividade vitamínica, sendo o beta caroteno o mais importante destes, pois apresenta 100% de atividade (2). Desde 1967 a FAO/OMS (14), recomenda que seja utilizada a expressão Equivalente de Retinol para demonstrar o teor de vitamina A dos alimentos.

Dados da literatura mostram que o valor de vitamina A dos alimentos de origem vegetal, é de maneira geral calculado pelo conteúdo total de carotenóides, dosados no comprimento de onda do beta caroteno.

Este procedimento leva a grandes discrepâncias quanto ao real valor dessa vitamina nos alimentos, tendo em vista que muitos dos carotenóides não são precursores de vitamina A, além do que geralmente ocorrem estereoisômeros cujo potencial vitamínico é sensivelmente menor do que o do beta caroteno (17, 21).

Com relação ao óleo de dendê, de grande potencial vitamínico A, os dados encontrados geralmente são expressos em carotenóides totais, quando se sabe que eles possuem quantidades expressivas de alfa e beta caroteno (13, 28). Poucos trabalhos têm abordado a ocorrência de estereoisômeros no óleo de dendê (10, 15, 26, 28).

O óleo da palmeira *Elaeis guineensis*, é conhecido no Brasil como óleo ou azeite de dendê, o qual é extraído da polpa do fruto do dendezeiro e se caracteriza por uma coloração que vai do amarelo ao vermelho, devido a presença de grandes quantidades de carotenóides. As variedades mais cultivadas no Brasil são a dura, a tenra e psífera, as quais são diferenciadas pela espessura da casca da semente. A variedade mais utilizada comercialmente é a tenra, produto do cruzamento das variedades dura x psífera (8, 22, 28).

Os carotenóides são mais estáveis em sistemas que contenham um mínimo de oxigênio. As várias duplas ligações dos carotenóides estão sujeitas à oxidação podendo ser catalisadas pela luz, aquecimento, presença de peróxidos e metais. A isomeria cis-trans, pode ocorrer especialmente durante os processos que envolvam aquecimento a temperaturas elevadas durante o processamento ou ainda durante o armazenamento. No entanto, estas transformações podem ser minimizadas utilizando-se baixas temperaturas ou diminuindo-se o tempo de armazenamento, que pode levar a perdas insignificantes (25, 26).

Assim, com o fim de avaliar o efeito do armazenamento a temperatura ambiente sobre os estereoisômeros e os teores de alfa e beta caroteno de óleos de dendê, amostras de óleo bruto e refinado foram submetidas à estocagem a 26°C, de forma a reproduzir suas condições de comercialização e armazenamento em nível doméstico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As amostras utilizadas no presente trabalho, foram constituídas de óleos de dendê bruto, recém produzido no Município de Ceará-Mirim (RN) e óleo refinado adquirido em supermercado de São Paulo. Esta amostra foi identificada como óleo refinado, devido as informações contidas no rótulo.

As amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro transparente e armazenadas a temperatura ambiente (26°C), em prateleiras abertas, expostas às condições de iluminação e temperatura ambiente, de onde foram retiradas alíquotas para análise a cada 30 dias, durante 90 dias.

2.2 Métodos

O método analítico utilizado para a determinação dos carotenóides foi o de RODRIGUEZ, descrito por ALMEIDA E PENTEADO (1), com algumas modificações para ser utilizado com produtos ricos em lipídios (3, 15, 27). Todas as etapas das análises foram realizadas evitando-se a exposição dos extratos dos carotenóides à luz direta, através da proteção com tecido escuro ou papel aluminizado e quando armazenados os extratos foram mantidos em geladeira ou congelador sob atmosfera de nitrogênio.

As amostras analisadas foram colocadas em banho-maria a $\pm 45^{\circ}\text{C}$, até que se tornassem líquidos homogêneos. Em seguida, foram pesadas em balança analítica e transferidas para erlenmeyers de 250 ml com auxílio de ± 50 ml de éter de petróleo, sendo vigorosamente agitadas até a completa dissolução do óleo.

O extrato contendo os pigmentos foi submetido à saponificação, pela adição de 200 ml de uma solução metanólica com 50% de KOH (p/v). A mistura foi colocada em erlenmeyer de 500 ml sob atmosfera de nitrogênio e agitada em agitador magnético por aproximadamente duas horas, protegida da luz e posteriormente deixada em repouso por mais 10 horas nas mesmas condições.

Após a etapa de saponificação, os pigmentos foram extraídos sob forte agitação, com porções de aproximadamente 30 ml de éter de petróleo, sendo transferidos para um funil de separação de 500 ml após cada extração, até que a fase metanólica se tornasse incolor. Posteriormente, o extrato etéreo foi lavado sucessivas vezes com água destilada, até que fosse eliminado todo o álcali. O resíduo aquoso foi eliminado pela adição de sulfato de sódio anidro. Em seguida, procedeu-se a filtração do extrato etéreo em papel de filtro comum. Caso a solução ficasse turva, repetia-se a saponificação por mais duas horas. O extrato contendo os pigmentos foi evaporado em evaporador rotatório entre 30 e 35°C, até um volume de aproximadamente 5 ml e aplicado a uma coluna de vidro de 20 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro interno, empacotada com uma mistura de MgO:hyflosupercel (1:1 e 1:2). Empregou-se como fase móvel um gradiente de 1 a 10% de acetona em éter de petróleo, admitindo um fluxo na coluna de aproximadamente 50 gotas por minuto. Das duas frações obtidas a acetona foi removida por lavagens sucessivas com água destilada.

Para a separação dos isômeros as frações obtidas na primeira cromatografia, foram recromatografadas empregando-se como adsorvente o Ca(OH)_2 , tendo-se utilizado como fase móvel o éter de petróleo puro. Para sua identificação, as frações separadas foram submetidas a uma varredura na faixa do comprimento de onda compreendido entre 320 a 510 nm. Os picos máximos dos espectros de absorção obtidos, foram comparados a valores previamente estabelecidos na literatura (4).

Verificou-se também, a ordem de eluição das frações na coluna, bem como determinou-se a distância percorrida por cada fração a partir do ponto de aplicação na camada delgada de sílica gel, desenvolvida com 3% de metanol em benzeno.

As frações separadas na coluna de Ca(OH)_2 , foram submetidas à reação de fotoisomerização, após o registro do espectro, através da adição de 3 gotas de uma solução de iodo e éter de petróleo, deixando-as expostas por 5 minutos à luz artificial (29). Os espectros de absorção foram comparados antes e depois da isomerização, tendo-se procurado verificar a mudança de configuração cis-trans, onde o deslocamento dos picos de absorção para comprimentos de onda menores (hipsocrômico), indicavam a forma *trans*, enquanto que o deslocamento para comprimentos de onda maiores (batocrômico) ou o não deslocamento, indicava a forma *cis*.

Em todas as frações isoladas foi realizado o teste para detecção de grupos epóxidos, através da exposição da placa de cromatografia a vapores de HCl , cuja mudança de coloração de amarelo para verde ou azul indica a presença de grupo epóxido.

A quantificação foi realizada partindo-se das absorbâncias máximas de cada carotenóide isolado, aplicando-se a Lei de Beer, e utilizando os valores de absortividade já tabelados na literatura (4).

O valor de vitamina A, foi determinado levando-se em conta as diferentes atividades biológicas das frações identificadas (5, 6).

2.2.1 Análise estatística

Foi constituída de dois tratamentos distintos. No primeiro, utilizou-se a análise de variância a 1 fator, a fim de verificar se ocorriam diferenças significativas nos teores dos isômeros detectados nos diversos momentos do experimento, tendo-se considerado como variável dependente os isômeros e como variável independente o tempo de armazenamento. O segundo tratamento, procurou verificar as diferenças existentes entre as médias, através do teste de comparação múltipla de Scheffé (9).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos óleos analisados foram identificados como precursores de vitamina A, o alfa e o beta caroteno (Tabela 1). Após a recromatografia do alfa caroteno em Ca(OH)_2 , foram isolados cinco isômeros, enquanto que da fração beta caroteno foram isolados qua-

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DO ALFA E BETA CAROTENO DOS ÓLEOS DE DENDÊ BRUTO E REFINADO

FRAÇÃO 1		ALFA CAROTENO	
Comprimento de onda em éter de petróleo (nm)	(418-420)*	439-41	469-474
RF em camada delgada de sílica gel		0,99	
FRAÇÃO 2		BETA CAROTENO	
Comprimento de onda em éter de petróleo (nm)	(423-426)*	443-46	470-473
RF em camada delgada de sílica gel		0,99	

* Os valores entre parênteses significam inflexão no lugar do pico.

tro isômeros, estando as suas características resumidas na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS ISÔMEROS DE ALFA E BETA CAROTENO DOS ÓLEOS DE DENDÊ BRUTO E REFINADO

FRAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO	ABSORÇÃO EM ÉTER DE PETRÓLEO (nm)	REAÇÃO DE FOTO-ISOMERIZAÇÃO
Isômeros de alfa caroteno			
1.1	Neo alfa caroteno U	468-440-417	Cis+
1.2	Alfa caroteno t-trans	472-443-420	Trans+
1.3	Neo alfa caroteno B	465-438-418	Cis+
1.4	Isômero 1 a	463-435-413	Cis+
1.5	Isômero 2 b	464-437-414	Cis+
Isômeros de beta caroteno			
2.1	Neo beta caroteno U	468-443-(421)*	Cis+
2.2	Beta caroteno t-trans	475-447-(423)*	Trans+
2.3	Neo beta caroteno B	466-441-(420)*	Cis+
2.4	Outros isômeros c	470-445 -	Cis+

* Os valores entre parênteses significam inflexão no lugar do pico.
a,b,c = isômeros não identificados.

As frações alfa e beta caroteno após serem recromatografadas mostraram-se misturas isoméricas, tendo como principal componente a forma todo trans. As frações 1.4 e 1.5 do alfa caroteno e a fração 2.4 do beta caroteno não puderam ser identificadas. O desenvolvimento destas frações na camada delgada de sílica, não demonstrou a presença de grupos funcionais enquanto que o teste de fotoisomerização realizado indicou a forma cis (29).

Na Tabela 3 e 4, estão apresentados os teores médios de alfa e beta caroteno total ($\mu\text{g/g}$) dos óleos bruto e refinado no início e final do experimento, além dos percentuais de perdas destas frações.

TABELA 3 - MUDANÇAS NA COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES ALFA E BETA CAROTENO ($\mu\text{g/g}$) DO ÓLEO DE DENDÊ BRUTO E PERCENTUAIS DE PERDA DECORRENTES DA ESTOCAGEM A TEMPERATURA AMBIENTE (26°C) DURANTE 90 DIAS

FRAÇÕES \ DIAS	0		90		PERDAS %
	Média	DP	Média	DP	
Alfa caroteno	56,66	5,15	56,37	10,63	0,51
Beta caroteno	223,36*	13,38	194,99	14,72	12,70

DP = desvio padrão

Pode-se observar que não ocorreu variação significativa no teor de alfa caroteno, correspondendo a perda de 0,51%, que poderia ser decorrente de pequeno nível de interconversão isomérica. Com relação ao beta caroteno pode-se observar variação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) levando a perda de 12,70% no final do experimento (Tabela 3). As perdas detectadas na fração beta caroteno foram decorrentes das alterações sofridas nos estereoisômeros neo beta caroteno B e na fração 2.4.

Com relação às mudanças nos teores médios totais de alfa caroteno ($\mu\text{g/g}$) no óleo de dendê refinado, pode-se constatar na Tabela 4 que as diminuições ocorridas ($P < 0,05$), determinaram perda de 19,76% no teor desta fração, tendo sido decorrente de alterações sofridas nos teores dos estereoisômeros neo alfa caroteno U e no neo alfa caroteno B. Com relação à fração beta caroteno, observou-se variação significativa ($P < 0,05$) entre o teor inicial e final acarretando diminuição de 20,91% no total médio. Os estereoisômeros responsáveis por esta variação foram o neo beta caroteno U, beta caroteno todo trans, neo beta caroteno B e a fração 2.4. Como se pode observar as alterações mais significativas ocorreram no óleo refinado, podendo ser decorrentes do processo de refino que retira parcialmente a proteção natural dos antioxidantes existentes no óleo bruto.

TABELA 4 - MUDANÇAS NA COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES ALFA E BETA CAROTENO ($\mu\text{g/g}$) DO ÓLEO DE DENDÊ REFINADO E PERCENTUAIS DE PERDA DECORRENTES DA ESTOCAGEM A TEMPERATURA AMBIENTE (26°C) DURANTE 90 DIAS

FRAÇÕES \ DIAS	0		90		PERDAS
	Média	DP	Média	DP	%
Alfa caroteno	63,91*	3,32	51,28	2,99	19,76
Beta caroteno	168,80*	5,41	133,50	2,52	20,91

DP = desvio padrão

Em decorrência da diminuição nos teores médios de alfa e beta caroteno dos óleos estudados, pode-se observar diminuição no teor de vitamina A, expresso em Equivalente de Retinol de 8,53% no óleo bruto e de 17,89% no óleo refinado.

O tipo de experimento realizado, não permite afirmar qual o mecanismo que teria ocasionado estas perdas. No entanto, consultando a literatura, verifica-se que diversos são os mecanismos que levam a degradação dos carotenóides com atividade biológica. Estas vias vão desde a formação de expóxidos, degradação térmica levando a formação de produtos incolores e estereoisômeros, além da fotodegradação e da isomerização espontânea (12, 16, 18, 19, 28).

Considerando o tipo de tratamento empregado, ou seja, armazenamento a temperatura ambiente (26°C), pode-se esperar que a degradação tenha ocorrido por isomerização espontânea e fotodegradação. Neste sentido, diversos experimentos têm sido conduzidos, principalmente com o beta caroteno, a fim de verificar a sua estabilidade em diversas condições de luz e temperatura, tendo sido verificada a degradação do beta caroteno e formação de isômeros com predominância da forma todo trans (18, 19, 20). Pelos resultados obtidos nesses experimentos, observa-se que pouca ou nenhuma conversão isomérica ocorreu. A forma trans do alfa e beta caroteno foi a principal forma isomérica detectada, o que está em consonância com os resultados do presente trabalho.

4 CONCLUSÃO

- O alfa e o beta caroteno foram os principais precursores de vitamina A detectados nos óleos de dendê bruto e refinado analisados;
- As frações alfa e beta caroteno mostraram-se misturas isoméricas nos óleos estudados, sendo as formas todo trans do alfa e beta caroteno, as principais detectadas;

- . Foram detectados nos óleos analisados os isômeros neo alfa caroteno U, neo alfa caroteno B, neo beta caroteno U e neo beta caroteno B;
- . O armazenamento a 26°C por 90 dias, promoveu pequenas perdas nos totais médios de alfa e beta caroteno no óleo bruto e refinado. O óleo refinado sofreu perdas consideravelmente maiores do que o óleo bruto.

Abstract

Crude palm oil from Rio Grande do Norte state, Brazil, and refined palm oil bought in a market in São Paulo, Brazil, were studied with the objective of evaluating changes in stereochemical composition and total alfa and beta carotene due to storage at room temperature (26°C) during 90 days. Storage did not produce changes in the kind of alfa and beta carotene stereoisomers. Storage produced a decrease in the total of alfa and beta carotene in crude palm oil (0,51 and 12,70% respectively) and in total alfa and beta carotene from refined palm oil (19,76 and 20,91% respectively). Losses in carotene content produces a decrease in vitamin A value in crude palm oil (8,53%) and in refined palm oil (17,89%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ALMEIDA, L.B., PENTEADO, M.C.V. Carotenóides com atividade provitamínica A de cenouras (Daucus carota L.) comercializadas em São Paulo, Brasil. Rev.Farm.Bioquim.Univ.São Paulo, v. 23, n. 2, p. 133-141, 1987.
- 02 BAUERNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. J.Agric.Food Chem., Washington D.C., v. 20, n. 3, p. 456-473, 1972.
- 03 BRITTON, G. General carotenoids methods. Methods Enzimology, New York, v. 111, p. 113-149, 1985.
- 04 DAVIS, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. 2.ed. London : Academic Press, 1976. v. 2.
- 05 DEUEL JR., J.H. et al. Stereochemical configuration and provitamin A activity. I. All-trans-beta-carotene and neo-beta-carotene U. Arch.Biochem., New York, v. 5, p. 107-114, 1944.
- 06 _____. IV. Neo-alfa-carotene B and neo-beta-carotene B. Arch.Biochem., New York, v. 7, p. 247-55, 1945.
- 07 DRICOT D'ANS, C.H. et al. Eficácia do projeto de combate à hipovitaminose A, anemia nutricional em bolsões de pobreza do Estado da Paraíba. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRICION, 7, Brasília, 1984. Resumos... Brasília : SLAN/INAN, 1984. p. 61.
- 08 HUNTER, R.F., KRACKENBERGER, R.M. Palm oil carotenoids. V. Examination of Sese palm oil. Biochemical J., London, v. 40, p. 492-493, 1946.

- 09 KEPPEL, G. Design and analysis: a researcher's handbook. New Jersey : Prentice-Hall, 1973. 658 p.
- 10 LALA, V.R., REDDY, V. Absorption of beta carotene from green leafy vegetable in undernourished children. Am.J.Clin. Nutr., Bethesda, v. 23, n. 1, p. 110-113, 1970.
- 11 LIMA, M.S.S., CALADO, A.C., SILVA, F.L. Estudo da hipovitaminose A em Natal em menores de 6 anos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRICION, 7, Brasília, 1984. Resumos... Brasília : SLAN/INAN, 1984. p. 132.
- 12 MARTY, C., BERSSET, C. Degradation products of trans-beta-carotene produced during extrusion cooking. J.Food Sci., Chicago, v. 53, n. 6, p. 1880-1885, 1988.
- 13 MULLER-MULOT, W. Carotinanalysen in rohem palmol. Fette Seifen.Anstr., Jargang, v. 1, p. 18-21, 1976.
- 14 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. National Research Council. Recommended dietary allowance. 9. ed. Washington, 1980. 185 p.
- 15 NAG, J.H., TAN, B. Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection. J.Chrom.Sci., Niles, v. 26, p. 463-469, 1988
- 16 ONYEWU, N.P., CHI-TANG, H., DAUN, H. Characterization of beta carotene thermal degradation products in a model food system. J.Am.Oil Chem.Soc., Champaign, v. 63, n. 11, p. 1437-1441, 1986.
- 17 PENTEADO, M. de V.C., ALMEIDA, L.B. Ocorrência de carotenóides em raízes de cinco cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz) do Estado de São Paulo. Rev.Farm.Bioq. Univ. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 39-49, 1988.
- 18 PESEK, C.A., WARTHERSEN, J.J. Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system. J.Food Sci., Chicago, v. 52, n. 3, p. 744-746, 1987.
- 19 _____. Characterization of the photodegradation of beta carotene in aqueous model systems. J.Food Sci., Chicago, v. 53, n. 5, p. 1517-1520, 1988.
- 20 PESEK, C.A., WARTHERSEN, J.J., TAOKIS, P.S. A kinetic model for equilibration of isomeric beta carotenes. J.Agric. Food Chem., Washington, v. 38, p. 41-44, 1990.
- 21 PIRIE, A. Vitamin A deficiency and child blindness in the developing word. Proc.Nutr.Soc., Cambridge, v. 42, p. 53-63, 1983.
- 22 RODRIGUES, E. Informações gerais sobre o dendezeiro. Alim. e Tecnol., São Paulo, v. 1, n. 10, p. 46, jul./ago.1986.

- 23 SANTOS, L.M.P., MARIATH, J.G.R., DRICOT D'ANS, C.H., DRICOT, J. Diagnóstico da carência de vitamina A na Paraíba. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRICION, 7, Brasília, 1984. Resumos... Brasília : SLAN/INAN, 1984. p. 82.
- 24 SIMMONS, W.K. Xeroftalmia and blindness in Northeast Brazil. Am.J.Clin.Nutr., Bethesda, v. 29, n. 1, p. 116-122, 1976.
- 25 SIMPSON, K.L., CHICHESTER, C.O. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. Ann.Rev.Nutr., Palo Alto, v. 1, p. 351-347, 1981.
- 26 SIMPSON, K.L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. Poc.Nutr.Soc., Cambridge, v. 42, p. 7-17, 1983.
- 27 TAN, B., GRADY, C.M., GAWIENOWSKI, A.M. Hydrocarbon carotenoid profiles of processed fractions. J.Am.Oil.Chem.Soc., Champaing, v. 63, n. 9, p. 1175-1179, 1986.