



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO β -CAROTENO E LICOPENO DA POLPA DO TOMATE E ANÁLISE POR CCD (CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA)

Franklin Kaic Dutra PEREIRA¹, Milena Tarciana FACCIO¹, Larissa Maria Gomes DUTRA², Nislanne Pereira LINHARES³, Paulo Sergio Gomes da SILVA¹

¹ Curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal de Campina Grande, CES, Cuité-PB. E-mail: franklin_kaic@hotmail.com. Telefone: (83) 3372 1920.

² Curso de Bacharelado em Nutrição, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, CES, Cuité-PB. E-mail: lara-dutra@hotmail.com. Telefone: (83) 3372 1937

³ Curso de Licenciatura em Química, Universidade Estadual da Paraíba, Campus – I, Campina Grande – PB. Email: lenypynk@hotmail.com. Telefone: (83) 3315 3356.

RESUMO

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de um mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação esta fundamentado, principalmente no fenômeno de adsorção. As substâncias ascendem por capilaridade diferente de acordo com sua natureza e com a intensidade da interação solvente com adsorvente. Este trabalho tem como objetivo extrair o licopeno e o β -caroteno do extrato de tomate industrial, esse processo é possível devido às propriedades de solubilidades dos compostos orgânicos, o licopeno é solúvel em álcool etílico devido às polaridades iguais, isso favorece a extração do licopeno quando o extrato é tratado com álcool, já que o β -caroteno não é solúvel em álcool. Para a extração do β -caroteno é utilizado o clorofórmio, pois o β -caroteno é solúvel neste por terem polaridades iguais, a adição da solução de NaCl é utilizada para retirar a água e as impurezas da solução de β -caroteno e clorofórmio. O aquecimento em banho-maria serve para favorecer a extração e garantir que todo o licopeno e o β -caroteno fossem extraídos em seus respectivos solventes apropriados.

PALAVRAS CHAVES: Extração líquido-líquido, cromatografia delgada, carotenoides.

1 INTRODUÇÃO

A cromatografia em coluna foi primeiramente empregada em 1906 pelo botânico russo TSWETT para isolar pigmentos de plantas. Outra configuração, a forma aberta denominada cromatografia em camada delgada, *Thin-Layer Chromatography* (CCD), foi introduzida no início da década de 50 por KIRCHNER e posteriormente popularizada por STAHL, (Snyder et al., 1979).



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Citam Cass et al. (2001), que o primeiro tratamento matemático da teoria da cromatografia foi desenvolvido em 1952 por Martin e Synge, rendendo a estes pesquisadores o prêmio Nobel.

Três tipos de fluídos com amplas diferenças de propriedades físico-químicas; líquidos e gases, de baixa e alta densidade (incluídos aqui os gases no estado supercrítico) podem ser empregados como fase móvel (Guiochon, 1993). São quatro os mecanismos de separação ou processos responsáveis pela retenção do soluto pela fase estacionária. Estes em consequência conduzem a quatro métodos básicos, além do líquido-sólido têm-se: líquido-líquido (partição), a troca iônica e a exclusão por tamanho.

A técnica da extração envolve a separação de um composto, presente na forma de uma solução ou suspensão em um determinado solvente, através da agitação com um segundo solvente, no qual o composto orgânico seja mais solúvel e que seja pouco miscível com o solvente que inicialmente contém a substância. Quando as duas fases são líquidos imiscíveis, o método é conhecido como "extração líquido-líquido". Neste tipo de extração o composto estará distribuído entre os dois solventes. O sucesso da separação depende da diferença de solubilidade do composto nos dois solventes. Geralmente, o composto a ser extraído é insolúvel ou parcialmente solúvel num solvente, mas é muito solúvel no outro solvente.

Em uma extração líquido-líquido, o composto que se deseja obter encontra-se dissolvido em um solvente A e para extraí-lo, emprega-se outro solvente B, sendo os dois solventes imiscíveis. A e B são agitados e o composto então se distribui entre os dois solventes de acordo com as respectivas solubilidades. A razão entre as concentrações do soluto em cada solvente é denominada "coeficiente de distribuição ou de partição", (K).

Com a extração de compostos orgânicos pode-se realizar uma cromatografia, que é um método físico-químico de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: fase móvel (gás, líquido ou um fluido supercrítico) e uma fase



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

estacionária (fixa, em uma coluna ou superfície sólida). Os vários tipos de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a cromatografia uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

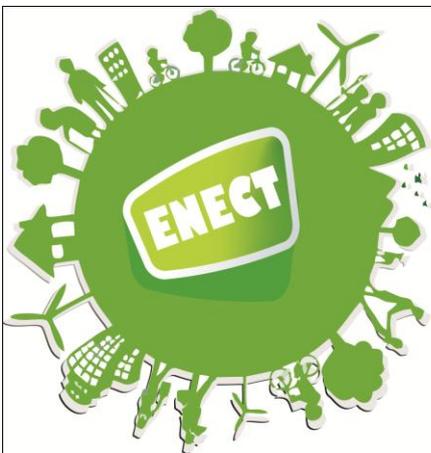
1.1. Carotenoides

Carotenoides são pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos sintetizados por vegetais, sendo alguns dos mais conhecidos o betacaroteno, alfa-caroteno, licopeno e luteína. O betacaroteno é um exemplo de um carotenoide provitamina A, ou seja, o que significa que pode ser convertido em retinol pelo nosso corpo, composto importante para o crescimento ósseo e para a visão. O licopeno por sua vez tem forte ação antioxidante no combate aos radicais livres com efeito anticancerígeno sobre a próstata. (FONTONA, 2012).

O betacaroteno e o licopeno podem ser obtidos principalmente em frutas e vegetais de coloração vermelha ou alaranjada. Por meio de uma extração com solventes orgânicos é possível se obter esses compostos a partir de extrato de tomate comum.

Os carotenoides são, em geral, pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo a laranja ou vermelho de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos cozidos e alguns peixes. Esses compostos tem ganhado evidência por terem efeitos benéficos à saúde. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas que confere aos carotenoides as suas atraentes cores. Carotenoides hidrocarbonetos são denominados simplesmente de carotenos. (ROSEIN, 2006).

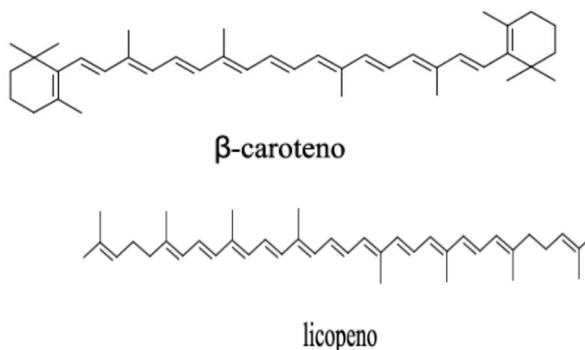
Dentre os principais carotenos estão os isômeros Licopeno e β -caroteno. O Licopeno possui uma estrutura acíclica com ligações duplas conjugadas e vem



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

sendo estudado, por exemplo, para o tratamento do câncer de esôfago, pulmão e próstata. O β -caroteno possui também ligações duplas conjugadas, mas com estrutura bicíclica, e é o carotenoide de maior potência vitamínica A (SILVA, 2001). O tomate possui esses dois compostos. Na Figura 1, são mostradas as estruturas desses compostos.

Figura 1 - Fórmulas estruturais de traços para o β -caroteno e para o Licopeno

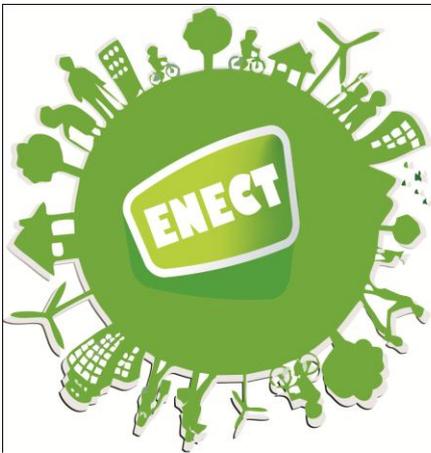


Fonte: SILVA, 2001

Apesar de serem isômeros, esses compostos apresentam diferentes solubilidades em solventes orgânicos devido às suas diferentes estruturas moleculares. Assim, consegue-se obter extratos de cada um desses compostos através de uma extração líquido-líquido de uma solução concentrada de tomate (extrato de tomate) em alguns solventes orgânicos.

1.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada fina (ou delgada) é uma técnica simples, barata e muito importante para a separação rápida e análise qualitativa de pequenas quantidades de material. Ela é usada para determinar a pureza do composto, identificar componentes em uma mistura comparando-os com padrões, acompanhar

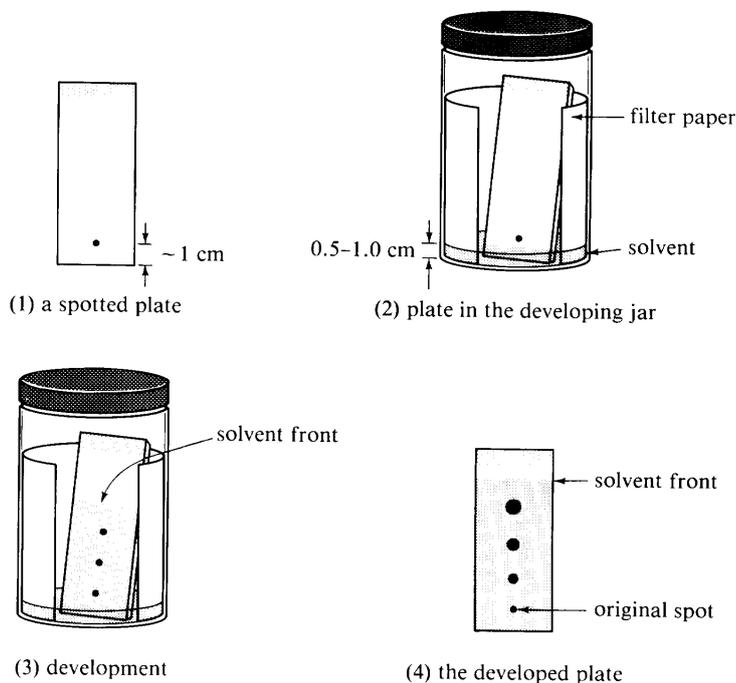


Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

o curso de uma reação pelo aparecimento dos produtos e desaparecimento dos reagentes e ainda para isolar componentes puros de uma mistura.

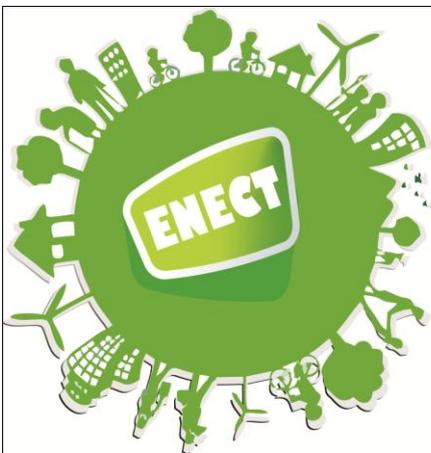
Na cromatografia de camada delgada a fase líquida ascende por uma camada fina do adsorvente estendida sobre um suporte. O suporte mais típico é uma placa de vidro (outros materiais podem ser usados). Sobre a placa espalha-se uma camada fina de adsorvente suspenso em água (ou outro solvente) e deixa-se secar. A placa coberta e seca chama-se “placa de camada fina”. Quando a placa de camada fina é colocada verticalmente em um recipiente fechado (cuba cromatográfica) que contém uma pequena quantidade de solvente, este irá eluirá pela camada do adsorvente por ação capilar (RÊGO, et. al. 199).

Figura 2 – Cromatografia em CCD



Fonte: Rêgo, et. al, 1999.

A amostra é colocada na parte inferior da placa, através de aplicações sucessivas de uma solução da amostra com um pequeno capilar. Deve-se formar uma pequena mancha circular. À medida que o solvente sobe pela placa, a amostra é compartilhada entre a fase líquida móvel e a fase sólida estacionária. Durante este



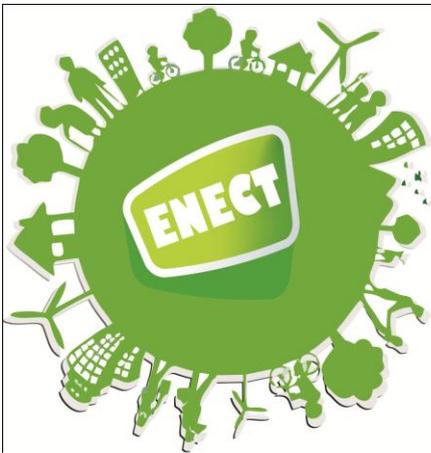
Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

processo, os diversos componentes da mistura são separados. Como na cromatografia de coluna, as substâncias menos polares avançam mais rapidamente que as substâncias mais polares. Esta diferença na velocidade resultará em uma separação dos componentes da amostra. Quando estiverem presentes várias substâncias, cada uma se comportará segundo suas propriedades de solubilidade e adsorção, dependendo dos grupos funcionais presentes na sua estrutura (Figura 2).

2 METODOLOGIA

2.1. ETAPA I – Extração do licopeno e do betacaroteno

Com o intuito da realização da Cromatografia de Camada Delgada para o licopeno e o betacaroteno foi necessária a extração desses compostos a partir de extrato de tomate. Em um béquer, inicialmente pesou-se aproximadamente 10 gramas de extrato de tomate. Enquanto o extrato de tomate era pesado, o banho-maria foi colocado para aquecer. Ao extrato pesado, adicionou-se 10 mL de Etanol 95%, e ao verificar-se com o auxílio de um termômetro que a temperatura do banho estava em 40° C, o béquer foi levado ao aquecimento, e mexeu-se a mistura cuidadosamente utilizando uma espátula pelo período de 5 minutos. Com a mistura agora aquecida e bem diluída, utilizando um papel de filtro circular, preparou-se um filtro estriado (em forma de leque) e filtrou-se a mistura para um erlenmeyer. Pressionou-se o papel de filtro contra o funil para a máxima obtenção de líquido. Reservou-se a polpa obtida em um béquer para a extração do betacaroteno, e ao líquido obtido adicionou-se uma pequena quantidade de Sulfato de sódio anidro, enquanto o erlenmeyer foi agitado por cerca de 1 minuto, com o intuito de retirar alguma água ainda existente. A mistura foi mantida em repouso por 3 minutos, em seguida realizou-se nova filtração obtendo-se assim o licopeno, de coloração amarelada.



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Após a obtenção do licopeno, à polpa previamente reservada adicionou-se, na capela, 10 mL de clorofórmio e manteve-se a mistura em constante agitação com auxílio de uma espátula por 5 minutos. Filtrou-se então a mistura para um erlenmeyer, conduzindo-a em seguida para um funil de separação, onde se adicionou ao sistema 4 mL de solução saturada de Cloreto de Sódio. Foram realizadas as técnicas de agitação recomendadas para um funil de separação (com a torneira fechada e o funil tampado, mover a vidraria em movimentos circulares, e em seguida ao recolocar o funil no suporte remover a tampa por alguns segundos para que qualquer gás desprendido fosse liberado), e em seguida realizou-se a separação das fases, sendo a parte mais densa da mistura heterogênea (parte inferior) a que foi recolhida para o erlenmeyer. Adicionou-se uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro, e assim foi obtido o betacaroteno, de coloração laranja viva. O licopeno e betacaroteno obtidos foram transferidos para pequenos frascos escuros recobertos por papel alumínio, a fim de isolá-los da luz solar.

2.2. ETAPA II – Cromatografia de Camada Delgada

Para a realização da cromatografia de camada delgada, utilizaram-se as placas. Em cada uma das três placas, com o auxílio de capilares, foram aplicadas amostras de licopeno e betacaroteno. Às três câmaras de eluição utilizadas foi adicionado um papel de filtro, e solventes diferentes, sendo eles hexano, clorofórmio e uma mistura dos dois anteriores. As placas foram então colocadas nas câmaras de eluição, até que houvesse uma boa adsorção. Em seguida as placas foram conduzidas à capela, para que se desse a evaporação dos solventes para poderem ir então para as câmaras de revelação, que continham cristais de iodo, por cerca de 8 minutos, até que ficou visível o arraste das amostras pela placa.

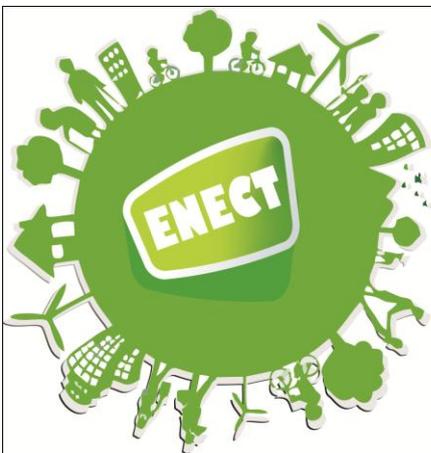
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

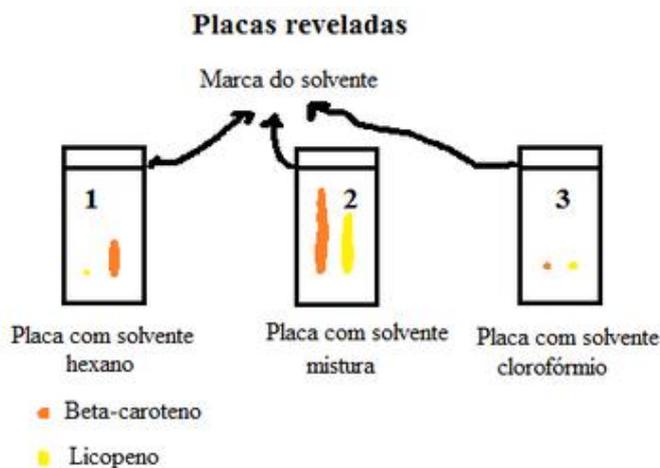
Realizaram-se os passos da metodologia e foram obtidos os carotenoides: licopeno e betacaroteno, presentes no extrato de tomate, que foram utilizados na cromatografia. Primeiramente, após a mistura do extrato de tomate com o etanol a 95%, houve a separação dos carotenoides do extrato de tomate, em que os carotenoides diluíram-se no etanol formando uma fase líquida (etanol 95% com os carotenoides) e uma polpa do extrato, a partir do princípio da extração líquido-líquido em que o composto se solubiliza no solvente em que ele possui maior afinidade, no caso, o etanol não devendo passar de 40° para obter uma maior pureza. Em seguida foi obtida a maior quantidade possível de líquido contendo o licopeno e o betacaroteno através da filtração. Para separação dos carotenoides foi feita uma nova filtração, depois da adição do sulfato de sódio anidro para que este reaja com o líquido filtrado, obtendo-se o licopeno. A partir da polpa retida no papel filtro foi extraído o betacaroteno, que estava cristalizado.

Após extração, foi possível observar a partir de qual dos solventes utilizados — clorofórmio, hexano e mistura de ambos — seria obtido um maior “arraste” do licopeno e do betacaroteno, tendo como adstringente a sílica gel, e o fator de retenção. Então, observam-se na Figura 3, que após a revelação por iodo, a mistura de clorofórmio e hexano houve um maior deslocamento de ambas as substâncias extraídas. A partir do “arraste” das substâncias é possível calcular o fator de retenção para cada uma das placas, onde vemos na Figura 4:



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Figura 3 – Analogia do resultado obtido laboratorialmente



Fonte: própria (2012).

Figura 4 – Resultado do índice de retenção

Rf = distância percorrida pelo solvente - distância percorrida pela substância

$$Rf1(\text{para o licopeno}) = 5,5\text{cm} - 0,0\text{cm} = 5,5\text{cm}$$

$$Rf1(\text{para o betacaroteno}) = 5,5\text{cm} - 0,5\text{cm} = 5,0\text{cm}$$

$$Rf2(\text{para o licopeno}) = 5,6\text{cm} - 0,0\text{cm} = 5,6\text{cm}$$

$$Rf2(\text{para o betacaroteno}) = 5,6\text{cm} - 0,0\text{cm} = 5,6\text{cm}$$

$$Rf3(\text{para o licopeno}) = 5,0\text{cm} - 2,5\text{cm} = 2,5\text{cm}$$

$$Rf3(\text{para o betacaroteno}) = 5,0\text{cm} - 1,2\text{cm} = 3,8\text{cm}$$

Fonte: própria (2012).

4 CONCLUSÃO

Ao realizar a extração, observa-se um olhar metodológico para aulas laboratoriais de química orgânica, com o intuito de motivar os alunos a um melhor entendimento sobre a extração líquido-líquido. Em relação à extração, foi minunciosamente quantificada nas substâncias necessárias para realização do mesmo. Sobre a CCD, a mistura de clorofórmio e hexano houve um maior



Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

deslocamento de ambas as substâncias extraídas, com o clorofórmio, não obteve nenhum deslocamento, e com o hexano, só o betacaroteno. Assim dá para fazer os cálculos do índice de retenção, mostrado nos resultados.

5 REFERÊNCIAS

CASS, Q. B., DEGANI, A.L.G., **Desenvolvimento de Métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação**, EdUFDCar, 77p, 2001.

Chasan, L. T., WILLET, W. C. **A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women**. Am J Clin Nutr 70(4): 509-16. 1999.

COSTA NETO, Claudio. **Análise Orgânica. Métodos e Procedimentos para Caracterização de Organoquímicos**. Vol 1 e 2. Editora UFRJ. Rio de Janeiro; 2004.

FONTONA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. **Carotenóides: cores atraentes e ação biológica**. Disponível no site: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio13/caroteno.pdf>. Acessado dia: 12/10/2102.

GUIOCHON, G.A., **Chromatography, Today and Tomorrow**, Analytical Acta, 283, 309-319, 1993.

Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Farfan, A. **Fontes Brasileiras de Carotenoides v. 1, p. 16-26, 2008.**

RÊGO, E.R. do; FINGER, F.L.; CASALI, V.W.D. **Qualidade de frutos de tomate da cv. Santa Clara, mutante de fruto amarelo e seus híbridos F1**. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 2, p. 106-109, julho 1999.

Silva, A. G. **Extração e estabilidade dos carotenoides obtidos de tomate processado (Lycopersicon esculentum Mill)**. p 16-24, 2001.

SNYDER, KIRKLAND, J. J., **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, sec. Ed., John Wiley & Sons, INC, 863p, 1979.

Ronsein, G; Miyamoto, S.; Bechara, E.; Di Mascio, P.; *Química Nova*, **2006**, Vol. 29, No. 3, 563-568.