

A provitamina A (β -caroteno) do azeite de dendê *

(*Eloeis melanococca*, GÄRT.)

por

Humberto T. Cardoso e Gilberto G. Villela

Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

(Com 1 estampa)

Na série de trabalhos que estamos realizando sobre óleos vegetais, especialmente sobre aqueles que têm qualquer indicação terapêutica, suposta ou comprovada, decidimos identificar os carotenoides do azeite de Dendê. Para isso, usamos material colhido de frutos de dendezeiros, da plantação do Instituto, organizada pelo DR. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO.

O óleo de Dendê, chamado comumente de *azeite de Dendê*, provem da polpa de frutos da espécie *Eloeis melanococca*, GÄRT., e é idêntico ao conhecido no estrangeiro como *palm oil*, que também pode provir da espécie *Eloeis Guineensis*, JACQ. Sua composição e, especialmente, o seu pigmento, têm sido amplamente estudados.

Assim, KUHN e BROCKMANN (1), examinando o pigmento vermelho do óleo de palma de Lagos, verificaram ser o mesmo uma mistura de α e β -carotenos. Nesse trabalho, os autores consideram o óleo estudado como a melhor fonte natural de α -caroteno, até então conhecida, pois, sua ocorrência aí é de cerca de 30-40 % da mistura total dos pigmentos.

LANZING e VAN VEEN (2) identificaram os mesmos carotenos no óleo de *Eloeis Guineensis*, variedade *pisifera*, e estimaram a sua quantidade em 750 U. I. de pro-vitamina A, por cc. do óleo, um mês após a extração, e de 590 U. I. para o óleo de um ano e meio.

DONATH e SPRUYT (3) também estudaram os carotenoides do óleo de palma, retirado da mesma espécie que a dos autores precedentes, sem indicação de variedade, e verificaram a presença dos α a β -carotenos, em quantidade equivalente a 445-660 U. I. de provitamina A por grama de óleo.

Finalmente, YAMAMOTO, ISU e ITO (4) confirmaram a presença nesse óleo dos dois carotenos acima citados.

* Recebido para publicação a 27 de setembro de 1940 e dado à publicidade em abril de 1945.

No nosso caso, entretanto, não encontramos o α -caroteno. Em óleo de amostras colhidas de dendezeiros bem antigos, o teor em β -caroteno foi inferior ao de dendezeiros novos. Ainda pudemos identificar a xantofila, em quantidade muito fraca, ao trabalhar com o óleo em natureza.

Na obtenção do material para este estudo, orientou-nos dentro do possível, a norma de seguir, os métodos primitivos de preparação do azeite destinado ao consumo público e que ainda se usam no norte do país. A razão de assim proceder foi para que, ao lado do trabalho essencialmente qualitativo, ainda pudéssemos formar uma idéia da riqueza do produto usado no comércio, muito embora com o envelhecimento, determinado pela demora do consumo, se perca a maior parte da pro-vitamina A, por oxidação pelo ar atmosférico.

E' interessante notar ainda que o azeite de Dendê é empiricamente aconselhado e empregado como medicamento, especialmente para doenças da pele.

O óleo para o nosso estudo foi, pois, obtido por fervura em água da polpa dos frutos, retirando-se o produto sobrenadante. Isto feito rapidamente e no mesmo dia forneceu-nos melhores resultados que outros métodos mais complicados. Os carotenoides, quando estão encerrados na fibra vegetal e bem protegidos pela dissolução no óleo, não sofrem oxidação sensível pelo aquecimento rápido a 100° C. (RETI, 5).

O produto assim obtido, depois de ficar por meia hora em banho-maria, a baixa temperatura (40° C.), é deixado em repouso para que se separe toda a água presente. Decanta-se e filtra-se o óleo em algodão de vidro, para retirar as impurezas, quando necessário.

Para o estudo qualitativo do insaponificável, preparou-se o material pelo método mais comumente usado. Trabalhando-se rapidamente, este método presta-se muito bem para substituir os que são normalmente indicados para retirar o pigmento dos óleos.

O óleo foi saponificado por aquecimento com KOH alcoólica, em banho-maria, por meia hora, com condensador de refluxo e em atmosfera de nitrogênio. O álcool foi depois evaporado sob pressão reduzida e o sabão dissolvido em água fervente (90-100°). A solução, diluída ao dobro com água destilada fria, depois de voltar à temperatura ambiente, foi extraída com éter etílico isento de peróxidos. Duas extrações são bastantes, desde que se façam agitações enérgicas. Isto, às vezes, determina a formação de emulsões difíceis de separar, o que se consegue corrigir com a adição de um pouco de álcool etílico.

O extrato etéreo, depois de lavado repetidamente com água destilada, para a retirada completa do sabão, é então seco com sulfato de sódio anidro e filtrado em algodão de vidro. A seguir, o éter é evaporado no vácuo e a baixa temperatura.

Os pigmentos do insaponificável foram examinados qualitativamente em dois solventes: clorofórmio e éter de petróleo.

Inicialmente aplicamos a técnica seletiva de KUHN e BROCKMANN, modificada por ZECHMEISTER (6), para os pigmentos carotenoides. Este método permite separar os pigmentos conforme as suas solubilidades nas diversas fases dos solventes.

O insaponificável é adicionado de álcool metílico, benzina e água, agitando várias vezes. Novamente junta-se benzina e álcool metílico a 90%. Depois de repousar a mistura, notou-se que somente a camada benzínica se achava corada, encerrando por conseguinte os carotenos.

A camada benzínica, agitada com terra de infusório, não deixou nenhum pigmento adsorvido, o que eliminou a possibilidade da presença do licopeno.

Outra verificação feita com o óleo em natureza, pelo método de fracionamento por mistura de solventes (Entmischung), segundo WILLSTÄTTER, com éter-éter de petróleo-álcool metílico a 85%, revelou na epifase a presença do caroteno, enquanto que a hipofase corou-se ligeiramente, indicando quantidade muito pequena de xantofila.

Os cromatogramas obtidos segundo WINTERSTEIN, em coluna de $\text{CaCO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, mostraram absorção somente na cabeça da coluna de Al_2O_3 , o que confirma a presença exclusiva de carotenos.

Os cromatogramas diferenciais em Al_2O_3 (padronizado segundo BROCKMANN), empregando solução do insaponificável em éter de petróleo, indicaram unicamente a presença de um só caroteno (7).

A ausência de poder rotatório nas soluções em CHCl_3 , feitas com os adsorbatos em Al_2O_3 , contribuiu para eliminar a possibilidade da presença de α -caroteno no pigmento do óleo de Dendê.

As reações químicas qualitativas comuns aos carotenos foram positivas, entre elas as de CARR e PRICE e de KUHN e WINTERSTEIN.

Os espectros de absorção da luz, fotografados em espectrógrafos Zeiss (fig. 1) e as curvas típicas de absorção espectral, obtidas em fotômetro Pulfrich (graf. 1 e dados na tabela 1), são elementos de confirmação da identidade do pigmento do óleo de Dendê como sendo caroteno.

Os espectrogramas da fig. 1 representam :

- a) solução em eter de petróleo de caroteno obtido de cenouras ;
- b) solução em eter de petróleo de insaponificavel do óleo. Vê-se que em ambos os casos a zona de absorção chega a 5100 U. Å.

As curvas espectrofotométricas (tab. 1), com soluções de várias concentrações, transportadas ao graf. 1, mostram as curvas típicas de absorção espectral do caroteno, com inflexão na região de 5000-5100 U. Å. Nesse mesmo gráfico, vê-se ainda a diferença que se obtem pelo emprêgo de dois diferentes solventes, pois os valores de E ($\log I_0/I$), correspondentes à solução em clorofórmio, são inferiores aos da de eter de petróleo, embora as concentrações sejam iguais.

Para as determinações quantitativas usamos o tintômetro Lovibond e o material foi preparado pela técnica de KUHN e BROCKMANN (1).

PARTE EXPERIMENTAL

Obtenção do óleo: Obteve-se o óleo pela fervura em agua da polpa dos frutos, retirando-se o produto que ia sobrenadando. Foi imediatamente filtrado em algodão de vidro e deixado por meia hora no banho-maria em baixa temperatura (40.°C.), para que se separasse toda a agua em suspensão.

O óleo obtido (Jun. 40) apresentava as seguintes características físicas e químicas:

Densidade, 25/25.°C.	0.9084
Índice de refração, 25.°C.....	1.4632
Índice de iodo (Hanus)	51
Índice de saponificação	213
Acidês livre, em ac. oleico %.....	20.7%
Residuo insaponificável	0.74%

Saponificação: A saponificação foi feita com pequenas porções de 10 grs. de óleo adicionadas de 20 cc. de álcool absoluto e 4 grs. de potassa dissolvidas na menor quantidade de agua possível. Essa mistura foi aquecida por meia hora com condensador de refluxo, em atmosfera de nitrogênio.

O álcool foi, então, evaporado sob pressão reduzida, e o sabão sêco dissolvido em 100 cc. de agua distilada a 90-100.°C. com agitação cuidadosa. Finda a dissolução, adicionou-se volume igual de agua distilada fria e, depois da solução completamente resfriada extraiu-se com eter isento de peróxidos, em funil de decantação, agitando com cuidado, para evitar a formação de emulsão forte. A adição de um pouco de álcool ajuda a quebrar essas emulsões.

Retirou-se a camada de sabão e novamente extraiu-se com eter, com os mesmos cuidados descritos. Duas extrações são o bastante, desde que se proceda com agitação suficiente.

Os dois extratos foram reunidos e lavrados várias vezes com água destilada, para retirar todo o sabão remanescente. Seguiu-se a secagem que foi feita com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se em algodão de vidro e destilou-se todo o éter com pressão reduzida.

O resíduo seco foi dissolvido imediatamente no solvente mais apropriado para a análise qualitativa.

Espectrografia: O exame espectrográfico foi feito em espectrógrafo Zeiss, usando soluções em éter de petróleo, do absorvato em Al_2O_3 e de caroteno puro.

Comparando as duas fotografias A e B, respectivamente, pigmento do óleo de Dendê e caroteno puro, verifica-se que, em ambas, a zona de absorção espectral chega à região de comprimento de onda de 5100-5000 U. Å.

Curvas de absorção espectral: Para traçarmos essas curvas usamos o fotômetro gradual de Pulfrich (Zeiss) empregando os filtros S72, S61, S57, S50, S47 e S43.

O material foi dividido em duas amostras: a) óleo de frutos colhidos em Dezembro de 1939, de dendezeiros antigos, e b) óleo de frutos colhidos em Junho de 1940, de dendezeiros novos. Convém notar que, assim que obtivemos o óleo de 1939, fizemos imediatamente todas as verificações que mencionamos neste trabalho, inclusive a determinação quantitativa. O material obtido em Junho de 1940 serviu para confirmar as observações anteriores, exceto na parte quantitativa, como se verá mais adiante. Assim, a análise física e química do óleo, antes referida, corresponde à amostra de 1940.

Examinado o gráfico 1, verifica-se que os valores de $E (\log I_0/I)$, correspondentes a curva 1, são inferiores aos da curva II, o que implica uma diferença de concentração para menos na primeira. Isto é confirmado pelo trabalho quantitativo, como se verá mais adiante.

Ainda aparece registada nesse gráfico a influência do solvente empregado. As curvas 2 e 3, feitas com a mesma concentração de caroteno, respectivamente, em clorofórmio e éter de petróleo, apresentam valores diferentes para o coeficiente E .

A curva 4 mostra-nos o efeito que tem a evaporação, à pressão atmosférica, do extrato etéreo, a qual determina uma diminuição da concentração do caroteno.

Finalmente, na curva 5, vê-se a absorção típica dada pela solução clorofórmica do insaponificável, depois da reação de CARR e PRICE.

Todas essas curvas espectrofotométricas estão em perfeito acordo com as obtidas com caroteno puro.

Análise cromatográfica: Empregamos, para a investigação dos pigmentos presentes no insaponificável, a coluna diferencial de WINTERSTEIN (8), de $CaCO_3/Al_2O_3$. Preparámos a coluna em tubo de vidro de 10 cc. de capacidade, graduado em 0.1 cc., colocando na parte inferior, até a divisão 7.3, o Al_2O_3 , de granulação padronizada segundo BROCKMANN (Merck), e, daí até a divisão zero, o $CaCO_3$ do tipo precipitado leve e seco.

A solução do insaponificável, em éter de petróleo, foi aspirada através dessa coluna, tendo-se desenvolvido o cromatograma com éter de petróleo puro.

Na divisão 7.3, exatamente, formou-se um único anel de absorção, com a cor comum ao caroteno, o que nos levou a concluir pela existência de um só pigmento. Como a adsorção se deu tipicamente na camada de Al_2O_3 , identificou-se o pigmento como sendo caroteno.

Em coluna de Al_2O_3 procuramos desenvolver o anel que se obtinha pelo modo acima descrito, empregando eter de petróleo, para o fim de verificar a presença dos carotenos isômeros. Não foi possível obter qualquer desdobramento, o que indica tratar-se de um só desses compostos. Ficou assim eliminada a possibilidade da presença do caroteno o que, aliás, foi plenamente confirmado pela ausência de poder rotatório, na solução clorofórmica do absorbato. Dosagem pelo tintômetro LOVIBOND: Para estas determinações, prepararam-se várias amostras pequenas de 10 grs. de óleo, empregando o método de KUHN e BROCKMANN. O pigmento correspondente a cada amostra de 10 grs. foi dissolvido em 25 cc. de clorofórmio.

As dosagens foram feitas comparando no tintômetro, a solução do pigmento tratada pelo reativo de CARR e PRICE, com as unidades azuis.

Os resultados obtidos são expressos no quadro seguinte:

	U. A.	U. DE β -CAROTENO POR GR. DE OLEO	U. I. DE PRO-VITAMINA A POR GR. DE OLEO
1ª amostra (Dez., 39).....	1.8	450	749
2ª amostra (Jun., 40).....	2.1	550	916

Os cálculos foram feitos pelos gráficos de WOLFF (9).

UA = Unidades azues LOVIBOND.

UI = Unidades internacionais de pró-vitamina A, segundo Conferência de Vitamina de Londres (1932).

BIBLIOGRAFIA

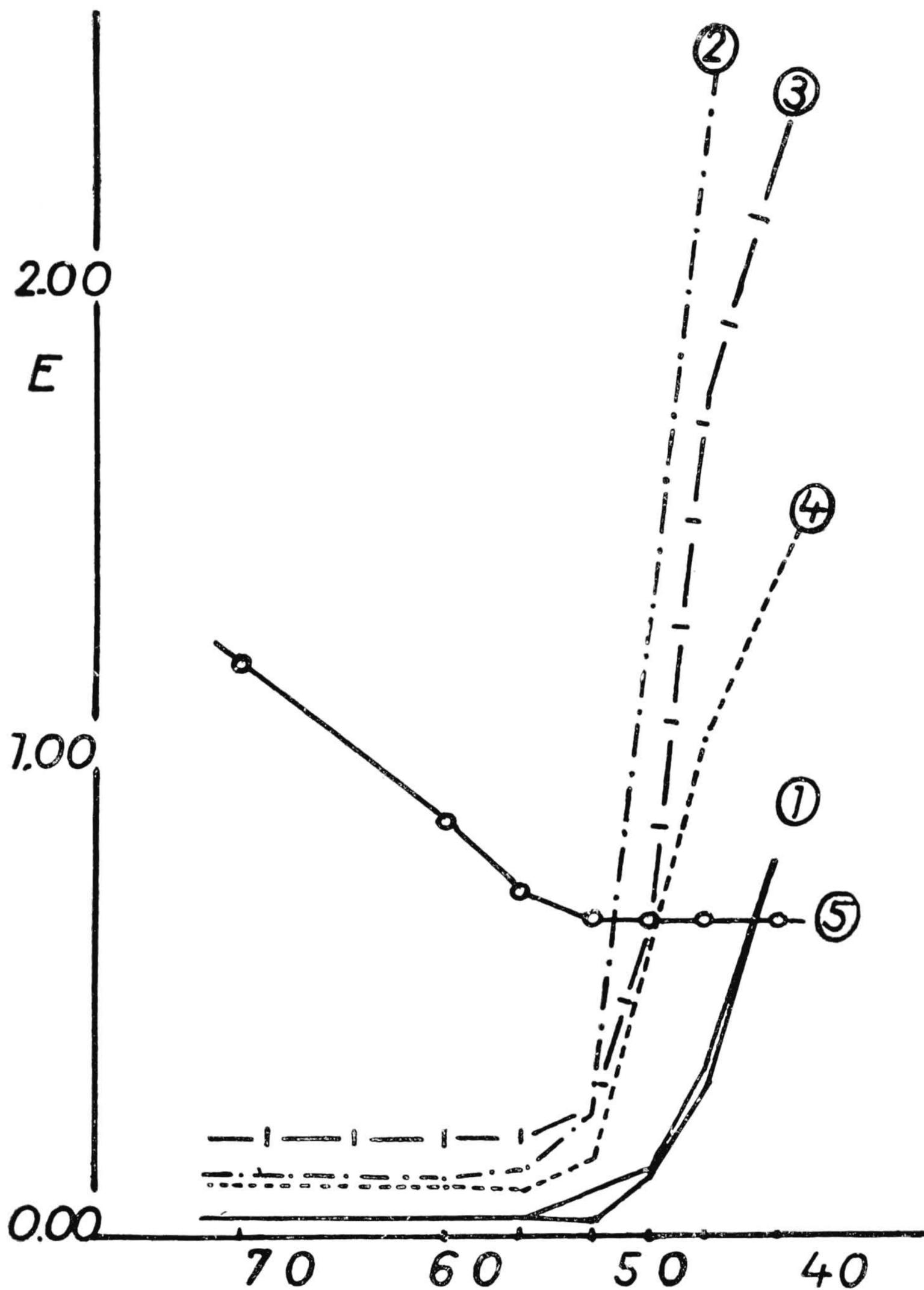
- 1 — KUHN e BROCKMANN — 1931 — Z. physiol Chem. — 200, 255.
- 2 — LANSIG e VAN VEEN — 1937 — Geneesk. Tijdschr. Med. Ind. — 77, 2777.
- 3 — DONATH e SPRUYT — 1938 — Def. Econ. Aff. Comm. Int. Serv. Bur. Comm. Batavia.
- 4 — YAMAMOTO, ISU e ITO — 1939 — J. Agr. Chem. Soc. Japan, 15, 521.
- 5 — RETI (L) — 1935 — Actas e Trabajos del V Cong. Nac. Med. — Rosário — Argentina.
- 6 — L. ZECHMEISTER — 1934 — Carotinoide, Julius Springer, Berlin.
- 7 — KUHN e BROCKMANN — 1933 — Ber. Dtsch. Chem. Ges, 66, 828.
- 8 — WINTERSTEIN — Zechmeister, op. Ct.
- 9 — WOLFF (L. K.) — 1938 — Zeitschr. Vitaminforschung, 7, 225.

TABELA I

Valores de $E (I_0/I)$ em cuba de 1 cm.

U. A.	CURVAS TIPICA DO GRAF. I				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
7200.....	0.04-0.045	0.13	0.21	0.11	1.22
6100.....	0.04-0.045	0.12	0.21	0.11	0.89
5700.....	0.04-0.040	0.14	0.21	0.10	0.74
5300.....	0.10-0.040	0.26	0.27	0.17	0.68
5000.....	0.14-0.130	1.30	0.66	0.62	0.68
4700.....	0.32-0.360	2.50	1.80	1.06	0.68
4300.....	0.80-0.800	—	2.40	1.42	0.68

- (1) — Insaponificavel da 1.^a amostra em CHCl_3 ;
 (2) — Insaponificavel da 2.^a amostra em CHCl_3 ;
 (3) — Insaponificavel da 2.^a amostra em eter de petróleo ;
 (4) — Insaponificavel da 2.^a em CHCl_3 (evaporado   pressão normal) ;
 (5) — Rea o de CARR e PRICE sobre o insaponificavel da 2.^a amostra em CHCl_3



Graf. 1: Curvas típicas espectrofotométricas de soluções do pigmento do óleo de Dendê

Fig. 1

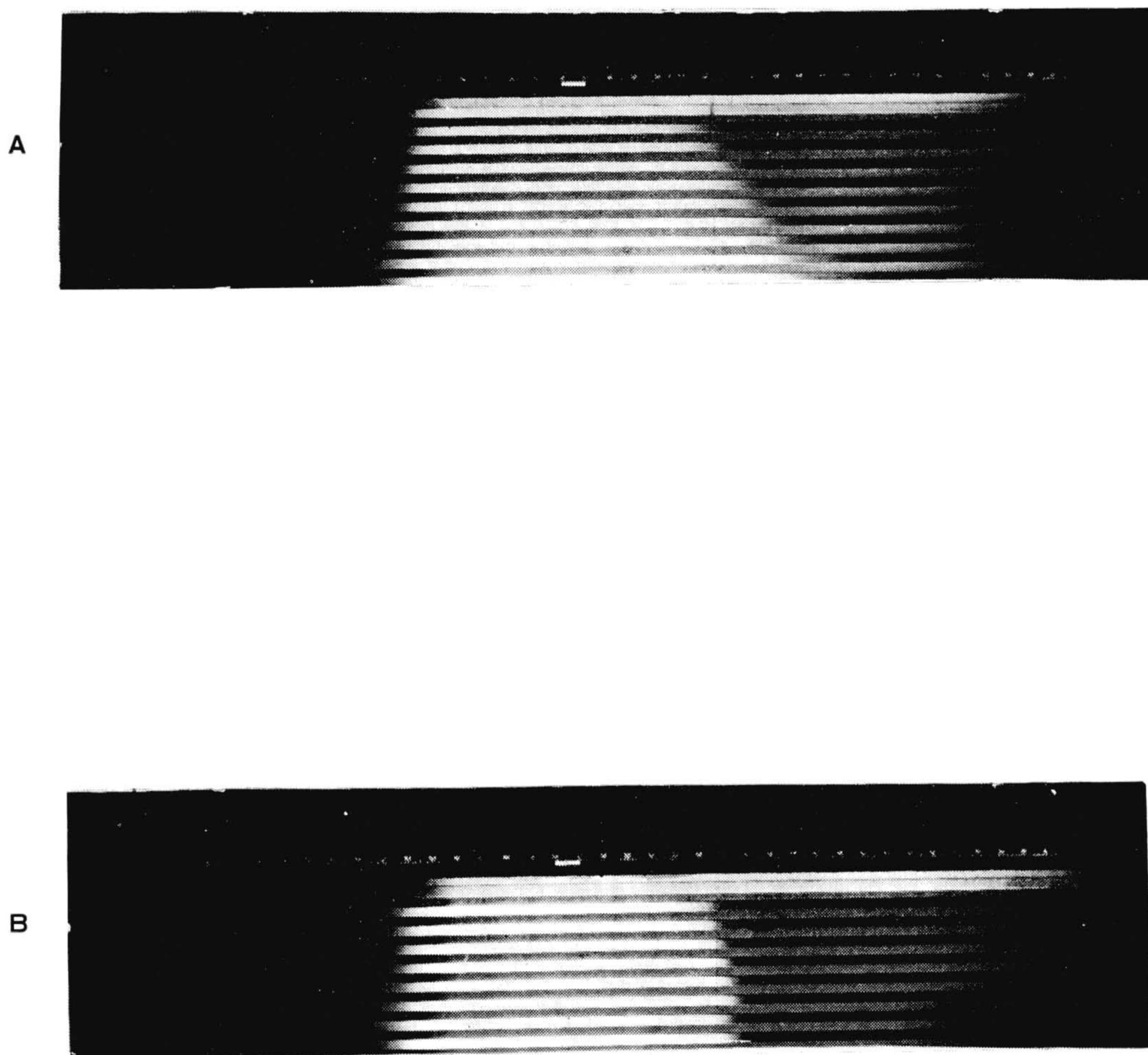


Fig. 1: Espectrogramas feitos com soluções em eter de petróleo de : A) pigmento do óleo de Dendê e B) caroteno puro.