

# ESTUDO DE MÉTODOS PARA A ANÁLISE SIMULTANEA DE ANTIOXIDANTES POR HPLC

Eduardo da Costa Eifert<sup>1</sup>; Selma Koakuzu<sup>2</sup>; Priscila Zaczuk Bassinello<sup>3</sup>; Rosângela Nunes Carvalho<sup>4</sup>; Ming-Hsuan Chen<sup>5</sup>

Palavras-chave: tocoferóis, tocotrienóis, orizanol, vitamina E, arroz.,

## INTRODUÇÃO

A vitamina E é representada por uma família de compostos de estrutura semelhantes, dos quais oito ocorrem na natureza ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  tocoferóis e tocotrienóis), tendo sido isolados de óleos de vegetais e outros materiais de plantas. Pesquisas demonstram que estes compostos auxiliam na supressão de patogêneses, como doenças cardiovasculares e inflamatórias, de câncer e de degeneração através de sua capacidade antioxidante ao proteger as membranas celulares, reduzindo plasma e o total de colesterol e LDL. Por sua vez, o  $\gamma$ -orizanol parece ter capacidades antiinflamatórias e pode reduzir o risco de incidência de tumores. Além disso, o  $\gamma$ -orizanol pode ser utilizado como um antioxidante natural para aumentar a estabilidade de alimentos processados e produtos farmacêuticos.

Nos grãos de arroz, estes compostos fitoquímicos se concentram nas camadas mais externas da cariópse e, por isso, a maioria dos métodos para a sua quantificação é direcionada às matrizes ricas nestes compostos, como o farelo ou do óleo de arroz (CHEN & BERGMAN, 2005; XU & GODBERG, 1999; ROGERS et al., 1993). Entretanto, no Brasil o arroz é geralmente consumido na sua forma polida, e como este produto é constituído basicamente de endosperma amiláceo, a detecção e quantificação de todos os seus fitoquímicos torna-se difícil devido a baixa concentração de alguns homólogos. De outra forma, os poucos métodos encontrados na literatura não realizam a análise simultânea dos tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e  $\gamma$ -orizanol. Geralmente os tocoferóis e tocotrienóis são analisados por RP-HPLC e o orizanol por HPLC em fase normal (HEINEMANN et al., 2008).

Portanto, o objetivo deste estudo foi o de aprimorar os métodos analíticos usados para quantificar os homólogos de vitamina E e  $\gamma$ -orizanol para amostras de arroz integral e branco polido e, desta maneira, fornecer ferramenta para estudos sobre os efeitos genéticos, ambientais, processamentos de pós-colheita, armazenamento e cocção, sobre os níveis destes compostos fitoquímicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

A variedade de arroz irrigado (*Oriza sativa* L.) IRGA 417 foi proveniente da Embrapa Arroz e Feijão, cultivada no município de Brazabrantes –GO no ano de 2010. Cerca de 200g da cultivar foi submetida ao beneficiamento em moinho de provas Suzuki MT-88, cerca de 100g da cultivar integral e 100g da amostra branco polido foram armazenada a 4°C. Aproximadamente 50 g das amostras branco polido e integral foram moídas em moinho martelo (Perten LM 3100) com peneira de abertura 0,5mm e armazenada a -20°C por 24 horas.

Dois métodos de extração dos antioxidantes homólogos de vitamina E e  $\gamma$ -orizanol foram efetuados. Utilizado como controle (CTL), o método de extração direta em metanol foi

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO 462 – Km 12, 75375-000 – Santo Antônio de Goiás/GO, eifert@cnpaf.embrapa.br.

<sup>2</sup> Bacharel em Química, Embrapa Arroz e Feijão, selma@cnpaf.embrapa.br.

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, Embrapa Arroz e Feijão, priscilazb@cnpaf.embrapa.br.

<sup>4</sup> Engenheira de Alimentos, Embrapa Arroz e Feijão, rosangela@cnpaf.embrapa.br.

<sup>5</sup> Química, USDA-ARD Rice Research Unit, mchen@ag.tamu.edu.

baseado no procedimento descrito por Chen & Bergman (2005) e adaptações sugeridas pelo próprio autor (CHEN, 2010): as amostras moídas (0,2 g) integral e branco polido foram submetidas a extração em 6 mL de metanol por 2 horas em agitação shaker (300 rpm) a 27°C, centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos e separado o sobrenadante. O procedimento foi repetido por 3 vezes e os sobrenadantes reunidos foram concentrados em centrífuga à vácuo (Centrivap Labconco) até volume final de 2,0 mL, filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas a análise cromatográfica. O método utilizando extração com hexano foi baseado em Katsanidis (1999) com algumas adaptações: as amostra moídas (2,5 g) branco polido e integral foram colocadas em tubo falcon de 50 mL, adicionado 8 mL de etanol absoluto e homogenizado em vortex por 30 segundos, 8 mL de água destilada foi adicionado ao tubo e as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos. Finalmente, foram adicionados 8 mL de hexano e as amostras homogeneizadas por mais 30 segundos, centrifugados por 8 minutos a 4°C e 3500 rpm, e separada a fase hexânica: o solvente foi removido usando centrífuga à vácuo (Centrivap Labconco) e o resíduo ressuspenso em 2,0 mL de metanol, filtrado em membrana de 0,45 µm e submetidos a análise cromatográfica. O mesmo procedimento utilizando hexano foi testado também em quantidades de amostra de 2,0; 1,5 e 1,0 g, e com 1 e 2 extrações com hexano, tanto para a amostra branco polido quanto para integral. As condições cromatográficas foram as mesmas para ambos os métodos.

Os padrões de tocoferóis (α, γ e δ) e tocotrienóis (α, γ e δ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, MO). O padrão de γ-orizanol foi gentilmente doado por Dra. Ming-Hsuan Chen do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A pureza dos padrões de tocoferóis e tocotrienóis foi calculada através dos coeficientes de extinção molar ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) segundo Chen & Bergman (2005) e valores de absorvância medida em Espectrofotômetro UV/VIS (Femto 700 plus).

As análises cromatográficas utilizaram Sistema de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) Shimadzu Prominence (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), com detectores de Fluorescência (RF-10AxL) e de Rede de Fotodiodos UV/VIS (SPD-M20A) ligados em série. Os extratos das amostras foram submetidos à separação por RP-HPLC em coluna Shin-Pack CLC-ODS (4,6 x 250mm, 5µm, Shimadzu) utilizando uma modificação do método de Chen & Bergman (2005). A separação cromatográfica dos sete compostos de interesse e a quantificação simultânea dos mesmos foi realizada usando um gradiente de fase móvel com condição inicial de 35% acetonitrila, 45% metanol, 10% isopropanol e 10% de ácido acético (1% v/v) a um fluxo de 1,5 mL/min. O tempo de corrida total foi de 42 min. Os tocotrienóis e tocoferóis (formas α, γ e δ) foram detectados por fluorescência a comprimento de onda de excitação 298 nm e de emissão 328 nm e o γ-orizanol por detector de UV/VIS a 325nm. A identificação e quantificação dos homólogos de vitamina E e γ-orizanol foram através dos tempos de retenção e curva de calibração de concentrações conhecidas dos padrões.

Os resultados foram submetidos à análise estatística com testes de comparação de médias (Tukey  $P < 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico SAS 2007.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias observadas para os isômeros dos tocotrienóis (T3), tocoferóis (Tf) e γ-orizanol para arroz integral e polido estão apresentados na Tabela 1.

Para arroz integral, observa-se que os métodos de extração utilizados permitiram recuperação igual ou superior de tocotrienóis e tocoferóis ao tratamento controle (CTL), com exceção de δ-Tf, que apresentou similaridade entre os tratamentos. O tratamento que se destacou foi aquele com duas extrações e 1,0 g de amostra, apresentando as maiores recuperações dos isômeros de tocoferóis e tocotrienóis. De forma geral, as maiores recuperações foram obtidas quando se aumentou o número de extrações e reduziram-se a quantidade de amostra. Por outro lado, apenas as extrações com 1,0 g de amostra permitiram obter concentrações de γ-orizanol similares ao tratamento CTL, possivelmente devido à

saturação do hexano pela quantidade de amostra.

**Tabela 1:** Concentração média de isômeros de tocotrienóis (T3), tocoferóis (Tf) e  $\gamma$ -oryzanol de arroz integral e polido, em diferentes métodos de extração e quantidade de amostra em relação ao tratamento controle (CTL).

Número de extrações	Peso da amostra, g	Tocotrienóis,			Tocoferóis			$\gamma$ -oryzanol ( $\mu\text{g/g}$ )
		$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T	$\gamma$ -Tf	$\alpha$ -Tf	
Arroz Integral								
1	1,0	1,496AB	17,165 ABC	0,437 A	0,063A	2,479AB	2,594A	135,167AB
2	1,0	1,617A	18,649 A	0,412 A	0,069A	2,564A	2,627A	146,62A
1	1,5	1,377BC	16,54 ABCD	0,319AB	0,057A	2,222ABC	2,215A	119,319BC
2	1,5	1,482AB	17,437 AB	0,295BC	0,068A	2,248ABC	2,147A	121,663ABC
1	2,0	1,267C	15,175 BCD	0,214CD	0,049A	1,913BCD	1,711A	105,372C
2	2,0	1,430B	16,194ABCD	0,212CD	0,056A	2,032 BC	1,762A	120,173ABC
1	2,5	1,286C	14,325 CD	0,221CD	0,051A	1,909 CD	1,692A	105,468C
2	2,5	1,474B	15,282 BCD	0,215CD	0,056A	1,975 CD	1,681A	120,335ABC
CTL	0,2	1,378BC	13,633 D	0,162 D	0,057A	1,688 D	1,099B	146,472 AB
Arroz Polido								
1	1,0	0,621ab	5,050a	0,095 a	0,012ab	0,583 c	0,462c	9,470 b
2	1,0	0,774a	5,830a	0,095 a	0,016a	0,665 a	0,483c	12,538 a
1	1,5	0,666ab	5,571a	0,095 a	0,013ab	0,622 ab	0,509abc	11,190 ab
2	1,5	0,708ab	5,955a	0,087 a	0,014ab	0,628 ab	0,464c	11,158 ab
1	2,0	0,638ab	5,514a	0,093 a	0,013ab	0,616 bc	0,548a	10,645 ab
2	2,0	0,698ab	5,958a	0,092 a	0,013ab	0,636 ab	0,546a	10,520 ab
1	2,5	0,547b	4,879a	0,079 a	0,011 b	0,534 d	0,484bc	9,165 bc
2	2,5	0,674ab	5,951a	0,089 a	0,014ab	0,626 ab	0,542ab	10,181 ab
CTL	0,2	0,678ab	4,060a	0,074 a	0,013ab	0,511 d	0,136d	6,885 c

Letras maiúsculas na coluna comparam arroz integral, Tukey P<0,05;  
Letras minúsculas na coluna comparam arroz polido, Tukey P<0,05;

Para arroz polido, observou-se que os métodos de extração testados apresentaram similaridade de recuperação dos tocotrienóis em relação ao tratamento CTL. Por outro lado, os métodos de extração proporcionaram maior recuperação dos tocoferóis e  $\gamma$ -oryzanol em relação à CTL.

De uma forma geral, observa-se que duas extrações promoveram as maiores recuperações dos análogos da vitamina E e para alguns isômeros, o maior peso da amostra não apresentou melhoras na quantificação. O tratamento com duas extrações de uma amostra de 1,0 g apresentou perfil claro, com picos bem definidos de todos os isômeros, sendo um tratamento que pode ser utilizado para a quantificação tanto de análogos da vitamina E, como de  $\gamma$ -oryzanol. Entretanto, apesar de promissor, mais testes devem ser realizados para a indicação como uma futura metodologia de extração.

## CONCLUSÃO

Embora ainda haja a necessidade de mais estudos e testes, duas extrações com hexano em amostras de 1,0 g mostrou-se promissora para a definição de uma nova metodologia para a extração e identificação simultânea de  $\gamma$ -oryzanol, tocotrienóis e tocoferóis.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa por financiar este projeto (03070500600 -NV) e ao USDA pelo auxílio nas análises de HPLC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, M.-H.; BERGMAN, C. J. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and  $\gamma$ -oryzanol contents. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.18, n. 2-3, p.139–151, 2005.

CHEN, M. -H. RE: **Brazilian Rice samples for analyses** [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por [pzbassin@cnpaf.embrapa.br](mailto:pzbassin@cnpaf.embrapa.br) em 04 de outubro de 2010.

HEINEMANN, R. J. B.; XU, Z.; GODBER, S.; LANFER-MAERQUEZ, U. M. Tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol contents in *japonica* and *indica* subspecies of rice (*Oriza sativa* L.) cultivated in Brazil. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 243-247, 2008.

KATSANIDIS, E.; ADDIS, P. B. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n.11-12, p. 1137-1140, 1999.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2724-2728, 1999.

ROGERS, E. J.; RICE, S. M.; NICOLOSL, R. J.; CARPENTER, D. R.; McCLELLAND, C. A.. ROMANCZYK Jr., L. J. Identification and quantification of  $\gamma$ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocols in rice bran oil. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 1993.

Se necessário, use este espaço para incorporar elementos extras ao resumo, como figuras ou tabelas maiores, sem contudo, exceder o limite de quatro páginas..