

Determinação de tocotrienóis em produtos do urucum

1 Objetivo

Determinar o teor Tocotrienóis em sementes e produtos de urucum.

1.1 Princípio do método

O método baseia-se na diluição da amostra em n-hexano, detecção e quantificação com uso de HPLC-Detector de fluorescência.

2 Aplicação

Aplica-se a amostras de sementes e produtos de urucum.

3 Método

3.1 Padrão e material de referência

Tocotrienóis (isolados de óleo de palma, em laboratório):

- DL- α -tocotrienol
- DL- β -tocotrienol
- DL- γ -tocotrienol
- DL- δ -tocotrienol
- Isolamento dos tocotrienóis: realizar várias injeções do óleo de palma dissolvido em n-hexano e filtrado em membrana de 0,45 μ m nas condições descritas nos itens 4.3 e 4.5, coletar as frações de cada *isoforma* em frasco separados, secar o solvente sob fluxo de nitrogênio e dissolver o resíduo em volume conhecido de n-hexano. Secar alíquota de cada *isoforma* sob fluxo de nitrogênio, dissolver o resíduo em etanol 95% e homogeneizar, por cerca de um minuto, em agitador de tubos. Realizar leitura em espectrofotômetro (as absorvâncias devem ficar entre 0,3 e 0,7) e determinar a concentração do isômero como descrito no item 4.7.1.1. Preparar uma solução de trabalho com as quatro *formas* de tocotrienóis com concentrações por mL de solução próximas a 1,2 μ g para α -tocotrienol, 2,4 μ g para β tocotrienol, 2,1 μ g para γ -tocotrienol e 2,0 μ g para δ -tocotrienol. A partir da solução com as quatro *formas* de tocotrienóis, retirar alíquota de 0,55 mL e diluir para 5 mL com n-hexano para injetar no HPLC. A preparação da solução para injeção no HPLC deve ser diária. A cada 15 dias, injetar o padrão no HPLC com uso do detector de UV para verificar possível degradação e a injeção deve ocorrer na mesma condição de análise quantitativa, com troca apenas do detector, e uso de comprimento de onda de 292 nm.

3.2 Equipamentos

- Balança analítica
- Espectrofotômetro UV-VIS
- Pipetas volumétricas
- Agitador de tubos
- Banho com ultrassom
- Bomba de vácuo
- Tocotrienóis – HPLC acoplado ao detector de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 294 nm e emissão de 326 nm; coluna de sílica com dimensões de 250x4 mm, 5 μ m
- Tocotrienóis, análise preparativa para isolamento dos tocotrienóis – HPLC acoplado ao detector de UV com monitoramento no comprimento de onda de 292 nm e coluna de sílica com dimensões de 250x4 mm, 5 μ m.

3.3 Materiais

- Espátula

- Pipeta de pasteur
- Balão volumétrico de 1000, 50, 25, 10 mL
- Sistema de filtração para fase móvel munido com kitassato de 2000 mL, e porta membrana de 47 mm de diâmetro
- Sistema de filtração para amostra munido de seringa de 5 mL, e porta filtro para membrana de 13 mm de diâmetro
- Tubo de ensaio de 5 mL com tampa e boa vedação
- Membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μm , com diâmetro de 13 e 47 mm
- Cubetas de quartzo

3.4 Soluções e reagentes

- n-hexano para cromatografia
- Acetato de etila para cromatografia
- Ácido acético p.a.
- BHT (butilhidroxitolueno)
- Fase móvel analítica para tocotrienóis - n-hexano:acetato de etila:ácido acético (97,6:1,8:0,6, v/v/v). Em balão volumétrico de 1000 mL colocar 18 mL de acetato de etila, 6 mL de ácido acético glacial e completar o volume com n-hexano. Filtrar em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μm e diâmetro de 47 mm, retirar os gases dissolvidos com uso de banho com ultrassom e bomba de vácuo por 5 minutos. Utilizar vazão de 1,5 mL por minuto.
- Fase móvel preparativa para isolamento dos tocotrienóis – n-hexano:acetato de etila:ácido acético (97,3:1,8:0,9, v/v/v). Em balão volumétrico de 1000 mL colocar 18 mL de acetato de etila, 9 mL de ácido acético glacial e completar o volume com n-hexano. Filtrar em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μm e diâmetro de 47 mm, retirar os gases dissolvidos com uso de banho com ultrassom e bomba de vácuo por 5 minutos. Utilizar vazão de 1,5 mL por minuto.

4 Procedimento

4.1 Fração insaponificável do óleo de urucum

- Pesar entre 0,02 e 0,07 g de amostra em balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com n-hexano.
- Homogeneizar em agitador de tubos por um minuto.
- Filtrar a amostra em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μm e diâmetro de 13 mm, recolher a amostra em tubo de ensaio com cerca de 5 mL com boa vedação.
- Injetar no HPLC.
- Fazer diluições necessárias para os isômeros ficarem com áreas próximas ao do padrão.

4.2 Sementes de urucum

- Pesar quantidade conveniente de amostra em balão de 250 mL com boca esmerilhada; adicionar 0,50 g de ácido ascórbico, 50 mL de etanol 95% e 20 mL da solução de hidróxido de potássio 50%;
- Colocar as amostras em banho-maria entre 80°C - 90°C, acoplados a condensadores e deixar saponificar por aproximadamente 30 minutos, com injeção de nitrogênio na amostra;
- Lavar os condensadores com 20 mL de etanol 95%;
- Esfriar em banho-maria;
- Transferir o extato para funil de separação com auxílio de água, adicionar 120 mL de éter etílico, agitar por aproximadamente 2 minutos;
- Aguardar separar as fases, retirar a amostra para nova extração e colocar o éter etílico em um erlenmeyer;
- Repetir o processo de extração com 120 mL de éter etílico;
- Juntar as frações de éter etílico;
- Lavar a fração de éter etílico com:

- 100 mL da solução de cloreto de sódio 10%;
- água destilada;
- 100 mL da solução de etanol 10%;
- água destilada.
- Lavar com água destilada até pH neutro, testar a água de lavagem com solução de fenolftaleína 1%.
- Passar o extrato por sulfato de sódio anidro e recolher em balão de 250 mL com boca esmerilhada, adicionar um pequeno cristal de BHT. Lavar bem o sulfato com éter etílico.
- Concentrar o extrato em evaporador rotatório com temperatura máxima de 40°C, não deixar secar, ou sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 40°C.
- Transferir o extrato para tubo, lavar bem o balão com éter etílico, e evaporar o solvente até secar sob fluxo de N₂.
- Retomar a amostra em 4 mL de n-hexano ou volume adequado e homogeneizar por aproximadamente 1 minuto no agitador de tubos.
- Filtrar a amostra em membrana com poro de 0,45 μm e diâmetro de 13 mm, recolher a amostra em tubo de ensaio com cerca de 5 mL e com boa vedação.
- Injetar no HPLC.

4.3 Correção da concentração das isoformas de tocotrienol

Leituras em Etanol 95%:

Analito	λ máximo (nm)	E _{1%} _{1 cm}
α-tocotrienol	292	86,0 ¹
β-tocotrienol	296	86,2 ³
γ-tocotrienol	297	91,0 ³
δ-tocotrienol	297	85,8 ³

5 Cálculos e expressão dos resultados

5.1 Cálculos

$$\text{Concentração de cada isoforma do tocotrienol (mg/100g)} = \frac{C_p \times A_a \times 100}{A_p \times m_i}$$

onde:

C_p = Concentração do padrão (injetado)

A_a = Área da amostra (cromatografia)

A_p = Área do padrão analítico (cromatografia)

m_i = massa de amostra injetada

5.2 Expressão dos resultados

Expressar o resultado como mg de cada isoforma de tocotrienol por 100 g ou 100 mL de amostra.

¹ EITNMILLER, R.; LEE, J. **Vitamin E – Food Chemistry, Composition and Analysis**. New York: Macel Dekker Inc., 2004.

6 Referências

FIRESTONE, D. (Ed.) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**, 6th ed. 2nd Printing, Urbana: AOCS 2012. Met. CE 8-89, p. 1-6.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO M. Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **Journal agriculture food chemistry.**, Washington, V. 51, P. 3940-3944, 2003.

WWW.OURUCUM.COM.BR