

Análise de geranilgeraniol em sementes e produtos do urucum.

1 Objetivo

Determinar o teor de geranilgeraniol em sementes e produtos de urucum.

1.1 Princípio do método

O método baseia-se na extração do geranilgeraniol com n-hexano, transferência para a fase móvel, detecção e quantificação por HPLC com detector de arranjo de diodos.

2 Aplicação

Aplica-se a produtos de urucum.

3 Método

3.1 Padrão analítico

- Geranilgeraniol, mínimo 85%.
- Preparo do padrão analítico: Diluir uma ampola com 100 mg de geranilgeraniol para 50 mL com *metanol*. Homogeneizar bem. Transferir o padrão para frasco âmbar com boa vedação. Transferir alíquota 0,5 mL para balão volumétrico de 50 mL (solução de trabalho).

3.2 Equipamentos

- Balança analítica
- Banho com ultrassom
- Pipetas volumétricas
- Bomba de vácuo
- Banho Maria
- Agitador de tubos
- HPLC acoplado ao detector de conjunto de diodos com monitoração à 210 nm, coluna de fase reversa C18 com dimensões de 250 x 4 mm, 5 µm

3.3 Materiais

- Balão volumétrico de 1000, 100, 50, 25, 10 mL
- Pipeta de pasteur
- Espátulas
- Béquer
- Espátulas
- *Provetas de 50 e 100 mL*
- Funil de separação de 250 e 500 mL
- Funil
- Balão volumétrico de 1000, 50, 25, 10 mL
- Tubos com tampa com volume entre 20-25 mL e 70 mL
- Filme plástico.

- 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
- Tubos de ensaio com cerca 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

3.4 Soluções e reagentes

- Metanol para cromatografia
- n-hexano para cromatografia
- Acetato de amônio p.a.
- Solução de acetato de amônio 50 mM. Pesar 0,38 g de acetato de amônio e diluir para 100 mL com água deionizada.
- BHT (butilhidroxitolueno)
- Eter etílico p.a.
- Solução aquosa de hidróxido de potássio 50% (m/v). Pesar 50,0 g de hidróxido de potássio, transferir para balão de 100 mL e completar o volume com água destilada.
- Solução aquosa de cloreto de sódio 10% (m/v). Pesar 100 g de cloreto de sódio, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- Solução aquosa etanólica 10% (v/v). Diluir 100 mL de etanol absoluto para 1000 mL com água destilada.
- Solução etanólica de fenolftaleína 1% (m/v). Pesar 1,0 g de fenolftaleína e diluir para 100 mL com etanol 95%.
- Solução etanólica de pirogalol 0,05% (m/v). Pesar cerca de 0,125 g de pirogalol e diluir para 250 mL com etanol 95% em balão volumétrico.
- Solução extratora composta de éter etílico : éter de petróleo : acetato de etila [60:30:5 (v/v/v)]. Misturar 630 mL de éter de etílico, 315 mL de éter de petróleo e 50 mL de acetato de etila.
- Fase móvel: metanol:acetato de amônio 50 mM (90:10, v/v). Transferir 100 mL de solução de acetato de amônio 50 mM para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com metanol para cromatografia. 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 ultrassom e bomba de vácuo por 15 minutos. Utilizar vazão de 1,0 mL por minuto.

4 Execução do ensaio

4.1 Amostra da fração insaponificável da extração de corante de urucum.

- Pesar ou pipetar entre 0,1g e 5g de amostra em béquer de 50 mL (a tomada de amostra depende da concentração esperada de geranilgeraniol)
- Adicionar 25 mL de n-hexano.
- Cobrir com filme plástico.
- Colocar em banho com ultrassom por 10 minutos.
- Filtrar em membrana de celulose regenerada de 0,45 μm .
- Secar alíquota sob fluxo de nitrogênio e diluir na fase móvel.
- Injetar no HPLC.

4.2 Sementes de urucum

- Pesar entre 2g ± 1g de sementes em tubo com capacidade para cerca de 70 mL
- Adicionar 20 mL de solução de etanólica de pirogalol e 10 mL de solução de KOH 50%. Agitar no agitador de tubos após cada adição.
- Colocar as amostras em banho-maria entre 80°C - 90 °C e deixar saponificar por aproximadamente 30 minutos.
- Esfriar em banho-maria.
- Adicionar 20 mL de solução extratora e levar ao banho com ultrassom por cerca de 2 (dois) minutos.
- Transferir a amostra para funil de separação, aguardar separar as fases, retirar a amostra para nova extração e colocar o solvente no erlenmeyer de 125 mL.
- Repetir o processo de extração com 20 mL de solução extratora por mais 3 (três) vezes, como descrito acima.
- Juntar as frações de solvente.
- Lavar bem o erlenmeyer com a solução extratora e recolher no funil de separação.
- Lavar a solução no funil de separação por 3 (três) vezes com 50ml de água destilada.
- Lavar a solução no funil de separação com:
 - 50 mL da solução de cloreto de sódio 10%;
 - 2 (duas) vezes com 50ml de água destilada;
 - 50 mL da solução de etanol 10%;
 - 50 mL de água destilada.
- Continuar a lavagem com água destilada até pH neutro, testar a água de lavagem com solução de fenolftaleína.
- Após a amostra atingir pH neutro, retirar toda a água e recolher a amostra em tubo com cerca de 70 mL. Adicionar um pequeno cristal de BHT na amostra.
- Colocar o tubo com a amostra em béquer com água com cerca de 40 °C. Concentrar a amostra sob fluxo de nitrogênio até secar.
- Suspender a amostra em 4 mL de n-hexano e homogeneizar por aproximadamente 1 (um) 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 Curva analítica

- A partir da solução de trabalho do padrão de geranilgeranio (100mg/50mL → 0,5mL:50mL), retirar alíquotas de 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mL, transferir para tubos, secar sob fluxo de nitrogênio e diluir na fase móvel.
- Agitar no agitador de tubos por um minuto.
- Filtrar em membrana de PTFE ou equivalente e recolher em tubo de ensaio.
- Injetar no HPLC.
- Traçar a curva de área x concentração e determinar a equação da reta.

5 Cálculos e expressão dos resultados

5.1 Cálculos

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

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 ou g geraniogeraniol por 100 g ou 100 mL de amostra.

6 Referência

SILVA, M. G.; LUIZ, F. A.; ROCHA, F. W.; LEAL, R. N.; CARVALHO, P. R. N. Validação de método analítico de determinação de geraniogeraniol em sementes de urucum. In: 2º Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum, Anais. Campinas, SP, 2010.