

## **AVALIAÇÃO DOS TEORES DE TOCOTRIENOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE URUCUM (*Bixa orellana*, L.)**

FLÁVIA R. P. TINTORI<sup>1</sup>; PAULO R. N. CARVALHO<sup>2</sup>; ENIELUCE S. B. PARRA<sup>3</sup>;  
MARTA G. da SILVA<sup>4</sup>;

**Nº 12219**

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de tocotrienol em diferentes acessos de urucum, da coleção existente em Pindorama-SP. Na realização do estudo foram utilizados vinte e dois acessos de urucum que tiveram os teores de umidade, lipídios, tocoferóis e tocotrienóis determinados. Os teores de umidade variaram entre 11,6 g 100g<sup>-1</sup> e 14,13 g 100g<sup>-1</sup> e de lipídios entre 2,89 g 100g<sup>-1</sup> e 4,35 g 100g<sup>-1</sup> em base seca. O método para avaliação dos tocoferóis e tocotrienóis foi validado e apresentou boa linearidade, precisão e limite de quantificação entre 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e 0,07 µg mL<sup>-1</sup> para os analitos γ-T, γ-T3 e δ-T3. Os teores de γ-T variaram entre 4,38 mg 100g<sup>-1</sup> e 13,03 mg 100g<sup>-1</sup>, entre 63,8 mg 100g<sup>-1</sup> e 216,94 mg 100g<sup>-1</sup> para γ-T3 e entre 340,46 mg 100g<sup>-1</sup> e 1198 mg 100g<sup>-1</sup> para δ-T3, respectivamente.

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the concentration of tocotrienol in different annatto accessions the collection that has been maintained in Pindorama – SP. In conducting the study were used twenty-two annatto accessions that had the moisture, lipids, tocopherols and tocotrienols evaluated. The moisture content varied between 11.6 g 100g<sup>-1</sup> and 14.13 g 100g<sup>-1</sup> and lipids between 2.89 g 100g<sup>-1</sup> e 4.35 g 100g<sup>-1</sup> dry basis. The method for evaluation of tocopherols and tocotrienols was validated and presented good linearity, precision and limit of quantification between 0.05 mg mL<sup>-1</sup> and 0.07 mg mL<sup>-1</sup> for the analytes γ-T3, γ-and δ-T3. The content of γ-T were between 4.38 mg 100g<sup>-1</sup> and 13.03 mg 100g<sup>-1</sup>, 63.8 mg 100g<sup>-1</sup> and 216.94 mg 100g<sup>-1</sup> for γ-T3 and 340.46 mg 100g<sup>-1</sup> and 1198 mg 100g<sup>-1</sup> for δ-T3, respectively

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Nutrição, UNIP, Limeira-SP, fa.paggiaro@gmail.com

<sup>2</sup> Colaborador/ Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, carvalho@ital.sp.gov.br

<sup>3</sup> Colaboradora/ Assistente Técnico a Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP, eni@ital.sp.gov.br

<sup>4</sup> Orientadora/Pesquisadora CCQA/ITAL, Campinas-SP, martags@ital.sp.gov.br

## **Introdução**

Os tocotrienóis (T3) assim como os tocoferóis (T) são substâncias que possuem atividade antioxidante reconhecida. Genericamente são conhecidos como vitamina E e podem ser facilmente identificados em óleos vegetais, germe de trigo, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde escuro e alimentos de origem animal, como gema de ovo e fígado além de sementes de plantas monocotiledôneas como o urucum (GUINAZZI et al., 2009; ZIELINSKI, 2008). Sua estrutura isoprênica apresenta-se com um anel cromanol e uma cadeia lateral com 16 átomos de carbono. Em razão da posição e número de grupo metila no anel cromanol são encontrados os isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (HARINANTENAINA, 2008). Os tocotrienóis apresentam-se como um óleo viscoso, inodoro e amarelo-claro (GUINAZZI et al., 2009). Segundo Costa (2007) tem-se dado bastante importância aos tocotrienóis por possuírem atividades biológicas importantes, como inibição do crescimento de células cancerígenas, redução no risco de doenças cardíacas e doenças degenerativas, bem como outras patologias oriundas do estresse oxidativo. Dentre as técnicas utilizadas para separação e quantificação de tocoferóis e tocotrienóis a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a mais recomendada por preservar os analitos. Segundo Paixão e Stamford (2004), o uso de colunas de fase normal ou reversa, acoplados à detectores de UV/VIS e/ou fluorescência torna a separação bastante eficiente. De acordo com Inmetro (2010), para confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, a validação deve ser realizada sempre que um método novo é desenvolvido. Os parâmetros necessários durante o processo de validação podem variar com o tipo de ensaio mas, em geral, envolvem exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, robustez, entre outros. Devido à importância dessas substâncias, o projeto teve como objetivo avaliar a concentração de tocoferol e tocotrienol em diferentes variedades (acessos) de urucum, utilizando para isso a coleção existente no Pólo Regional Centro Norte, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, em Pindorama – SP.

## **Materiais e Métodos**

### *Matéria prima e padrões*

As sementes utilizadas foram provenientes do banco de germoplasma instalado no Pólo Regional Centro Norte da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA, no município de Pindorama – SP. As cachopas foram colhidas

manualmente e secas ao sol, separadas, embaladas e transportadas até o local de estudo. As sementes recebidas foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

O padrão de tocotrienol foi preparado utilizando como matéria prima um óleo de palma com nome comercial – TOCOMIN®. (Carotech, Malasia), e o padrão de tocoferol utilizado foi fornecido pela Calbiochem, artigo 613424, composto por quatro ampolas com os isômeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$  -tocoferol. O conteúdo das ampolas foi diluído em hexano e a concentração determinada pelo coeficiente de absorção no comprimento de onda de máxima absorção (Tabela 1).

**TABELA 1.** Tocoferóis e Tocotrienóis: comprimento de onda de máxima absorção e coeficientes de absorção no solvente etanol 95%.

Analito	$\lambda$ máximo (nm)	$E_{1cm}^{1\%}$
$\alpha$ -tocoferol	292	70,0 – 73,7 <sup>(1)</sup>
$\beta$ -tocoferol	297	86,0 – 87,0 <sup>(1)</sup>
$\gamma$ -tocoferol	298	90,0 – 93,0 <sup>(1)</sup>
$\delta$ -tocoferol	298	91,2 <sup>(1)</sup>
$\alpha$ -tocotrienol	292	86,0 <sup>(3)</sup>
$\beta$ -tocotrienol	296	86,2 <sup>(3)</sup>
$\gamma$ -tocotrienol	297	91,0 <sup>(3)</sup>
$\delta$ -tocotrienol	297	85,8 <sup>(3)</sup>

(1) DESAI e MACHLIN, 1985; (2) MACHLIN, 1991; (3) EITNMILLER e LEE, 2004.

#### *Preparo do padrão de tocotrienóis*

O isolamento dos T3 foi realizado em um sistema de cromatografia líquida composto por bomba modelo 9002 (Varian) acoplado ao detector UV-variável modelo 9050 (Varian), com monitoração no comprimento de onda de 292 nm. A separação foi realizada em coluna de fase normal Si 60, 250 x 4 mm d.i., fase móvel composta por n-hexano: acetato de etila: ácido acético (97,3:1,8:0,9, v/v/v), com vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Foram coletadas frações, secas sob fluxo de nitrogênio, dissolvidas em etanol 95% e a concentração determinada pelo coeficiente de absorção (Tabela 1).

#### *Determinação da umidade e lipídios*

A determinação de umidade foi baseada no método descrito por HORWITZ et al., (2010). Cinco gramas de sementes foram secas em estufa à  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e pesadas até peso constante.

O método para determinação de lipídios foi segundo a descrição de HORWITZ et al. (2010). Dez gramas de sementes foram colocadas em extrator tipo Soxhlet, mantidas em refluxo, com hexano, por 8 horas. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo com temperatura entre 60 a  $65^{\circ}\text{C}$ , o balão foi seco em estufa a  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, e o teor de lipídios calculado.

### Validação

A validação do método foi baseada nos parâmetros do Inmetro (2010) e Quattrocchi et al. (1992).

**Sensibilidade:** avaliada com a construção de uma curva analítica composta pelos analitos com sete concentrações considerando a origem. As concentrações utilizadas foram entre 0,60 e  $1,81 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\alpha$ -T, 1,24 e  $3,73 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\beta$ -T, 1,21 e  $3,63 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\gamma$ -T, 1,16 e  $3,49 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\delta$ -T, 0,58 e  $1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\alpha$ -T3, 1,21 e  $3,64 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\beta$ -T3, 1,03 e  $3,09 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\gamma$ -T3 e 1,00 e  $3,09 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $\delta$ -T3, respectivamente. As estimativas de limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinadas com curvas suplementares, com três concentrações inferiores a menor concentração dos analitos, injetadas em triplicata. A linearidade da curva analítica e os LD e LQ foram obtidos com a aplicação das equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (1)$$

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2) \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Onde:  $t_r$ , valor *t-student* calculado;  $r$ , correlação linear;  $n$ , número de medidas;  $Y_{bl}$ , estimativa da resposta do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração área<sup>-1</sup>);  $S_{bl}$ , estimativa de desvio do padrão do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração s<sup>-1</sup>);  $b$ , coeficiente angular da curva analítica.

**Precisão:** do sistema foi obtida com cinco injeções, consecutivas, de um ponto da curva analítica, e do método foi avaliada com seis repetições analíticas,

simultâneas e independentes. O coeficiente de variação (CV) encontrado entre as repetições foi avaliado segundo Horwitz (1982) (Equação 4).

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (4)$$

Onde: C, concentração estudada expressa como potência de 10 (ex. 1mg 1000g<sup>-1</sup> (ppm) = 10<sup>-6</sup>, CV = 2<sup>4</sup> = 16%).

*Avaliação do sistema de extração:* avaliado com adição dos analitos, em dois níveis e em triplicata, no branco de reagentes. A variação entre as recuperações foram avaliadas estatisticamente pela Equação 5.

$$t_{cal} = \left( \left| x - \bar{X} \right| / s \right) \sqrt{n} \quad (5)$$

Onde:  $t_{cal}$ , *t-student* calculado;  $\bar{X}$ , corresponde a 100%;  $\bar{X}$ , recuperação média; s, estimativa de desvio padrão das recuperações; n, número de medidas.

#### *Preparo da amostra*

Em cerca de 2,0±0,2g de sementes foram adicionados 10mL de solução de pirogalol 0,05% etanólica, 5mL de solução de hidróxido de potássio 50%, e saponificado em banho maria com temperatura entre 80-85°C por aproximadamente 30 minutos. A extração dos analitos foi realizada com 4 porções de 10 mL de solução extratora, de forma sequencial, composta de éter etílico: éter de petróleo: acetato de etila (60:30:05, v/v/v) em banho ultra-som por cerca de 2 minutos. As frações foram combinadas, lavadas com soluções de cloreto de sódio 10% e etanol 10%, seguido de porções de água até pH neutro. O pH da solução de lavagem foi avaliado com solução de fenolftaleína 1% etanólica. O extrato foi transferido para tubo, adicionado BHT (butilhidroxitolueno), seco sob fluxo de nitrogênio, diluído em 10mL de hexano e filtrado em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45µm, diluído 0,3mL para 10mL, para quantificar γ-T e realizado diluições diversas, a partir da última, para quantificar o γ-T3 e δ-T3. Na quantificação foi utilizado uma bomba marca RadPump série III acoplado ao detector de fluorescência marca Waters modelo 2475 com uso dos comprimentos de onda de 294nm para excitação e 326 nm para emissão. A separação dos analitos ocorreu em coluna de fase normal de Si 60, 250 x 4 mm d.i., tendo como fase móvel n-hexano:acetato de etila:ácido acético (97,6:1,8:0,6, v/v/v) com vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, em sistema isocrático. A quantificação foi com uso de padrão externo composto pelos isômeros γ-Tocoferol (T) e γ- e δ-Tocotrienol (T3).

## Resultados e Discussão

### Isolamento e concentração dos isômeros de tocotrienóis

Os isômeros de T3 isolados apresentaram as seguintes concentrações: 29,23 mg 50mL<sup>-1</sup> para  $\alpha$ -T3, 5,40 mg 10mL<sup>-1</sup> para  $\beta$ -T3, 41,26 mg 50mL<sup>-1</sup> para  $\gamma$ -T3 e 14,32 mg 25mL<sup>-1</sup> para  $\delta$ -T3, respectivamente.

### Validação

**Sensibilidade:** os dados obtidos no teste estão apresentados na Tabela 2. O valor *t-student* para  $n - 2$  graus de liberdade com 95% de probabilidade é 2,57 e os valores *t* calculados para a linearidade foram 74,50 para  $\alpha$ -T, 59,72 para  $\beta$ -T, 57,69 para  $\gamma$ -T, 57,69 para  $\delta$ -T, 91,26 para  $\alpha$ -T3, 223,60 para  $\beta$ -T3, 158,10 para  $\gamma$ -T3 e 91,26 para  $\delta$ -T3, respectivamente. Baseado nos valores obtidos, a correlação foi significativa para a faixa avaliada.

**TABELA 2.** Parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados.

Analito	RL: Curva analítica ( $\mu\text{g}$ área <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )	RL: Curva LD e LQ ( $\mu\text{g}$ área <sup>-1</sup> )	RL: Curva LD e LQ ( $\mu\text{g}$ s <sup>-1</sup> )	LD ( $\mu\text{g}$ mL <sup>-1</sup> )	LQ ( $\mu\text{g}$ mL <sup>-1</sup> )
$\alpha$ -T	A=997748c + 22990	0,9991	A=120067c - 64250	A=15619c - 1884	4,0E-02	4,8E-02
$\beta$ -T	A=574614c + 34991	0,9986	A=680894c - 32097	A=6331c - 300	3,3E-02	3,5E-02
$\gamma$ -T	A=715589c + 45088	0,9985	A=839899c - 31771	A=11759c - 3418	3,4E-02	5,3E-02
$\delta$ -T	A=751064c + 49745	0,9985	A=897776c - 43432	A=831 + 5045	4,5E-02	7,2E-02
$\alpha$ -T3	A=1131097c - 18486	0,9994	A=1306439c - 76248	A=46552c - 7189	5,0E-02	7,6E-02
$\beta$ -T3	A=402965c + 3833	0,9999	A=474368c - 309665	A=4314c - 161	4,5E-02	4,6E-02
$\gamma$ -T3	A=699272c + 7738	0,9998	A=849780c - 54349	A=1330 + 3017	5,2E-02	7,0E-02
$\delta$ -T3	A=638749c - 10562	0,9994	A=710960c - 27363	A=20443c - 4304	3,6E-02	6,4E-02

RL, equação de regressão linear; c, concentração; s, estimativa de desvio padrão das áreas obtidas nas três injeções de cada concentração; A, Área; T, Tocoferol; T3, Tocotrienol.

**Precisão:** os resultados obtidos nos testes de precisão do sistema e do método estão apresentados na Tabela 3. Os coeficientes de variação encontrado nos testes (Tabela 3) foram menores que os obtidos com a equação de Horwitz (1982), portanto as precisões do sistema e do método foram adequadas.

**Tabela 3:** Valores encontrados no teste de precisão do sistema e método para tocoferóis e tocotrienóis.

Analito	Precisão	Valor médio	s	CV (%)	CV Max (%)
$\gamma$ -T	Sistema (n 5; área)	2064649	48225	2	3
	Método (n 5; mg 100g <sup>-1</sup> )	4,39	0,12	3	
$\gamma$ -T3	Sistema (n,6; área)	1660929	37248	3	5
	Método (n 5; mg 100g <sup>-1</sup> )	59	1	3	
$\delta$ -T3	Sistema (n 5; área)	1444962	28445	2	5
	Método (n 5; mg 100g <sup>-1</sup> )	280	13	5	

s, estimativa de desvio padrão; CV, coeficiente de variação; CV Max, coeficiente de variação obtido pela equação de Horwitz (1982).

**Avaliação do sistema de extração:** as recuperações obtidas com o teste estão apresentadas na Tabela 4. O valor *t-student* calculado foi comparado com o valor *t* tabelado com (n-1) de liberdade para uma probabilidade de 95% (*t* tabelado (95%; 5) é igual a 2,57). Os resultados obtidos, para os dois níveis de adição, foram menores que o tabelado, que sugere um método preciso, embora exista perda dos analitos durante as etapas de execução, pois a recuperação média foi 77%.

**TABELA 4:** Valores obtidos no teste de avaliação do sistema de extração.

Analito	Valor adicionado (mg 100g <sup>-1</sup> )	Valor recuperado (mg 100g <sup>-1</sup> )			$\bar{X}$	s	CV (%)	CV Max (%)	% Recup.	t cal
$\gamma$ -T3	1,00	0,83	0,82	0,71	0,79	0,06	8	8	79	1,57
	1,99	1,74	1,59	1,72	1,68	0,08	5	5	84	
$\delta$ -T3	6,73	5,07	4,65	4,27	4,67	0,40	9	13	69	1,29
	13,45	10,88	10,04	10,57	10,5	0,43	4	13	78	

$\bar{X}$ , média; s, estimativa de desvio padrão, CV, coeficiente de variação.

### Umidade e Lipídios

Os valores encontrados para umidade e lipídios nas amostras avaliadas estão apresentados na Tabela 5. As amostras apresentaram um valor médio de umidade de 12,3 g 100g<sup>-1</sup>, sendo que a amostra 106 foi a semente que apresentou maior umidade



(14,13 g 100g<sup>-1</sup>). As amostras da safra anterior, 2010, apresentaram teor entre 6,06 ± 1,10 g 100g<sup>-1</sup> e 8,67 ± 0,01 g 100g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2011), bem abaixo dos resultados apresentados no presente estudo, possivelmente devido ao período de colheita que no estudo anterior ultrapassou o ponto de maturação do fruto. A amostra 106 foi a que apresentou a maior concentração de lipídios, 4,35 g 100g<sup>-1</sup>, enquanto que na amostra 114 foi encontrada a menor concentração (2,05 g 100g<sup>-1</sup>). Esses resultados foram similares aos observados para amostras da mesma coleção, obtidas na safra de 2010 (SILVA et al., 2011). Naquela oportunidade a concentração de lipídios das amostras variaram de 1,45 ± 0,05 g 100g<sup>-1</sup> a 3,33 ± 0,03 g 100g<sup>-1</sup>.

**TABELA 5.** Resultados de umidade, lipídios, tocoferóis e tocotrienóis obtidos nas amostras avaliadas.

Acesso	Umidade (g 100g <sup>-1</sup> )		Lipídios (base seca) (g 100g <sup>-1</sup> )		γ-T (base seca) (mg 100g <sup>-1</sup> )		γ-T3 (base seca) (mg 100g <sup>-1</sup> )		δ-T3 (base seca) (mg 100g <sup>-1</sup> )	
	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s
104	13,24 <sup>a</sup>	0,10	3,04 <sup>a</sup>	0,04	4,96 <sup>a</sup>	0,32	77,4 <sup>a</sup>	4,2	364,10 <sup>a</sup>	12,81
105	11,68 <sup>b</sup>	0,32	3,19 <sup>b</sup>	0,04	10,75 <sup>b</sup>	0,45	111,3 <sup>be</sup>	4,6	350,7 <sup>a</sup>	21,3
106	14,13 <sup>c</sup>	0,31	4,35 <sup>c</sup>	0,10	9,25 <sup>c</sup>	0,15	115,34 <sup>b</sup>	2,06	256,3 <sup>b</sup>	256,3
107	12,24 <sup>d</sup>	0,10	3,17 <sup>b</sup>	0,05	8,54 <sup>c</sup>	0,23	107,11 <sup>bef</sup>	0,54	516,3 <sup>c</sup>	17,7
108	12,7 <sup>e</sup>	0,4	3,22 <sup>b</sup>	0,05	4,38 <sup>a</sup>	0,04	74,25 <sup>a</sup>	0,64	424 <sup>a</sup>	18
109	12,74 <sup>e</sup>	0,30	2,93 <sup>d</sup>	0,06	9,61 <sup>c</sup>	0,81	100,2 <sup>bf</sup>	1,4	550 <sup>c</sup>	38
110	11,99 <sup>d</sup>	0,11	3,50 <sup>e</sup>	0,04	13,03 <sup>d</sup>	0,34	124,1 <sup>b,e</sup>	2,5	201 <sup>b</sup>	1
111	11,7 <sup>b</sup>	0,1	3,75 <sup>f</sup>	0,12	17,4 <sup>e</sup>	1,0	154,15 <sup>c</sup>	4,55	787,05 <sup>d</sup>	5,83
112	11,9 <sup>b</sup>	0,2	3,07 <sup>a</sup>	0,01	8,70 <sup>c</sup>	1,1	216,94 <sup>d</sup>	18,61	1198 <sup>e</sup>	92
113	11,62 <sup>b</sup>	0,08	3,54 <sup>e</sup>	0,10	7,04 <sup>f</sup>	0,04	101,7 <sup>b,i</sup>	2,5	412,8 <sup>a</sup>	7,2
114	11,95 <sup>b</sup>	0,07	2,05 <sup>g</sup>	0,07	5,10 <sup>a</sup>	0,01	75,72 <sup>a</sup>	1,64	361,96 <sup>a</sup>	2,75
115	12,21 <sup>d</sup>	0,07	3,75 <sup>f</sup>	0,03	12,50 <sup>d</sup>	1,11	116,61 <sup>e</sup>	3,75	500 <sup>c</sup>	30
116	12,13 <sup>d</sup>	0,41	3,00 <sup>ad</sup>	0,04	9,25 <sup>c</sup>	0,95	74,11 <sup>a</sup>	0,02	421 <sup>a</sup>	13
117	11,62 <sup>b</sup>	0,16	2,89 <sup>d</sup>	0,10	8,04 <sup>c,i</sup>	0,71	96,32 <sup>f</sup>	4,53	517 <sup>c</sup>	14
118	11,68 <sup>b</sup>	0,14	3,32 <sup>h</sup>	0,10	9,78 <sup>c</sup>	0,96	97,6 <sup>b,i</sup>	7,5	556 <sup>c</sup>	7
119	12,25 <sup>d</sup>	0,16	3,2 <sup>b</sup>	0,1	11,8 <sup>bd</sup>	0,3	93,2 <sup>f</sup>	0,6	374 <sup>a</sup>	1
120	12,1	0,5	3,3 <sup>h</sup>	0,02	8,67 <sup>c</sup>	0,22	89,90 <sup>a,i</sup>	1,55	340,46 <sup>a</sup>	4,33
121	12,05 <sup>d</sup>	0,15	3,83 <sup>f</sup>	0,01	7,12 <sup>cf</sup>	0,22	111,7 <sup>b,e</sup>	0,7	510 <sup>c</sup>	6
122	11,28 <sup>f</sup>	0,04	3,02 <sup>a</sup>	0,03	12,44 <sup>d</sup>	1,05	98,5 <sup>b,i</sup>	6,1	464,5 <sup>c</sup>	29,5
123	11,7 <sup>b</sup>	0,1	3,56 <sup>e</sup>	0,03	10,4 <sup>bc</sup>	1,2	119,1 <sup>b,e</sup>	1,6	572,7 <sup>c</sup>	24,5
125	13,18 <sup>a</sup>	0,31	3,39 <sup>h</sup>	0,15	5,7 <sup>f</sup>	1,3	74,73 <sup>a</sup>	4,00	427 <sup>a</sup>	5
126	14,06 <sup>c</sup>	0,13	3,3 <sup>bh</sup>	0,19	5,96 <sup>af</sup>	0,23	63,8 <sup>a</sup>	0,7	456 <sup>c</sup>	24

$\bar{X}$  , média; s, estimativa de desvio padrão. Médias na mesma coluna com letras iguais, não existe diferença significativa, com uma probabilidade de 95%, pelo teste de Tukey.



### *Tocoferóis e Tocotrienóis*

Os valores encontrados para tocoferol e tocotrienol no óleo da extração de lipídios e nas sementes estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Foram encontrados valores para  $\gamma$ -T entre 4,38 mg 100g<sup>-1</sup> (acesso 108) e 13,03 mg 100g<sup>-1</sup> (acesso 110), e valores para tocotrienóis ( $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3) entre 340,46 mg 100g<sup>-1</sup> (acesso 120) e 1198 mg 100g<sup>-1</sup> (acesso 112). Foram encontrados teores maiores de tocotrienóis e menores de tocoferóis nas sementes avaliadas, conforme relatado por FREGA et al. (1998) em óleo. Segundo FREGA et al. (1998), o óleo de urucum apresenta teores maiores de tocotrienóis e menores de tocoferóis, com teores entre 140 mg 100g<sup>-1</sup> e 147 mg 100g<sup>-1</sup> em sementes secas, a determinação realizada no óleo obtido da extração de lipídios. O teor de tocotrienol encontrado no estudo foi bem superior, provavelmente por ter ocorrido a saponificação sob condições controladas de temperatura e com uso antioxidantes, conforme pode ser observado nos valores apresentados nas Tabelas 5 e 6.

**TABELA 6.** Teores de tocoferóis e tocotrienóis avaliados no óleo da extração de lipídios das sementes e expressos em mg 100g<sup>-1</sup>.

Acesso	Isômeros (mg 100g <sup>-1</sup> )					
	$\gamma$ -tocoferol		$\gamma$ -tocotrienol		$\delta$ -tocotrienol	
	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s
106	0,65	0,05	8,50	0,60	51,37	2,56
108	0,65	0,03	9,76	0,08	67,88	26,43
110	1,21	0,01	13,14	0,20	61,64	4,82

$\bar{X}$  , média; s, estimativa de desvio padrão.

### **Conclusão**

O método validado apresentou-se linear para os oito isômeros de tocoferóis e tocotrienóis nas faixas avaliadas, limite de quantificação entre 0,05 µg mL<sup>-1</sup> e 0,07µg mL<sup>-1</sup> para os analitos  $\gamma$ -T,  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3, precisão adequada e exatidão média de 77% na avaliação do sistema de extração. O teor de  $\delta$ -T3, nos vinte e dois acessos, variou entre 340,46 mg 100g<sup>-1</sup> a 1198 mg 100g<sup>-1</sup>, em base seca. O acesso 106 apresentou a maior umidade (14,13 g 100g<sup>-1</sup>) e o maior teor de lipídios (4,35 g 100g<sup>-1</sup>, em base seca).



## Agradecimentos

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

## Referências

- COSTA, C.K. **Estudo Fitoquímico de Bixa orellana; Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DESAI, I.D.; MACHLIN, L.J. Vitamin E. In: AUGUSTIN, J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D. (Ed.). **Methods of Vitamin**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1985. p. 255-283.
- EITNMILLER, R.; LEE, J. **Vitamin E – Food Chemistry, Composition and Analysis**. New York: Marcel Dekker Inc., 2004.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 75, n. 12, p. 1723-1727, 1998.
- GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e Tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Rev. Química Nova**. v.32, n.8, p.2098-2103, 2009.
- HARINANTENAINA, L. Tocotrienols in Plants: Sources and Importance. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. **Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols**. The American Oil Chemist's Society (AOCS), 2008. cap.4, p.43.
- HORWITZ, W. (Ed). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. (Current through revision 3, 2010)
- HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, pg. 67A – 76A, 1982.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2010. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf). Acesso em 2 jul 2012
- MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: \_\_\_\_\_. **Handbook of Vitamins**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. cap. 3, p.99-144.
- PAIXÃO, J. A; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas Lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica. **Rev. Química Nova**, v.27, n.1, p.96-105, 2004.
- QUATTROCCHI, O. A. ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F. **Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA, 1992, p.301-328.
- SILVA, F.A.L. da. et al. Avaliação dos teores de geraniolgeraniol em diferentes acessos de urucum. Extração, separação e purificação de geraniolgeraniol extraídos de sementes de urucum. In: 5º CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC 2011. Campinas: EMBRAPA, 2011.
- ZIELINSKI, H. Tocotrienols: Distribution and Sources Cereals – Role in Human Health. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. **Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols**. The American Oil Chemist's Society (AOCS), 2008. cap.3, p. 24.