

Validação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na determinação do teor de óleo em sementes de mamona

Denilson Gouvêa Anthonisen¹
Manoel Artigas Schirmer²
Eliane Freire Anthonisen³
Sérgio Delmar dos Anjos Silva⁴
Máira Milani⁵
João Guilherme Casagrande Jr.⁶

Introdução

Devido ao elevado valor comercial dos óleos vegetais, a produção em escala industrial não pode prescindir da extração por solvente, pois na prensagem mecânica, mesmo sob alta pressão, em torno de 5% do óleo contido no material extraído ficam retidos na torta, teores que podem ser reduzidos a 0,5%, quando solventes orgânicos são utilizados (MORETTO; FETT, 1998). Segundo Christie (1993), vários solventes ou combinações deles são usuais extratores de óleo (Tabela 1).

Hoseney (1991) atribui tal propriedade à variedade e à complexidade das substâncias que a denominação óleo abrange, desde ácidos graxos livres até lipoproteínas. O autor destaca, por exemplo, que lipídios não polares, como ácidos graxos livres e triglicerídios, compõem a fração solúvel em clorofórmio, enquanto os polares, como fosfolipídios e glicolipídios, dissolvem-se em metanol. O hexano é o solvente orgânico preferido no processo de extração, por ser o mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água (Tabela 1),

¹Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, mestrando do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, (denilson@cpact.embrapa.br)

²Quím., Dr., Prof. da Universidade Federal de Pelotas, (schirmer@ufpel.edu.br)

³Graduanda do curso de bacharelado em química da Universidade Federal de Pelotas, (eliane.f.a@ibest.com.br)

⁴Eng. Agrôn., Dr., pesquisador da Embrapa Clima Temperado (sergio@cpact.embrapa.br)

⁵Eng. Agrôn., MSc., pesquisadora da Embrapa Algodão, (maira@cnpa.embrapa.br)

⁶Eng. Agrôn., Dr., bolsista de pós-doutorado da Fundação de Apoio à Pesquisa Edmundo Gastal, FAPEG, (jgcasa@uol.com.br)

o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO; FETT, 1998). No entanto, sua inflamabilidade, custo e potencial poluidor, justificam o estudo de alternativas ao seu uso.

Para trabalhos em escala laboratorial, Mendham *et al.* (2002) afirmam que a escolha da técnica analítica, além de segurança e custo, deve considerar outros critérios, como o tempo de execução do ensaio, o volume de testes que serão realizados, a natureza e a quantidade de amostra. Segundo os autores, métodos destrutivos, cujo processo de preparo de amostras ou a própria determinação

envolvem a dissolução e/ou fragmentação do material em estudo, implicam, portanto, em transformação da matriz para melhorar a detecção do analito. Isto consome tempo, exige investimento e gera fonte de erros, como a diluição. Os autores afirmam, ainda, que métodos instrumentais, baseados em propriedades físicas, como absorção ou emissão de energia, condutividade elétrica, rotação óptica, são capazes de fornecer informações quantitativas de um analito, preservando as características das amostras e gerando resultado.

Tabela 1. Detalhes técnicos de métodos de extração de óleo.

| Método | Aplicação | Vantagem | Limitação |
|--|----------------------------|--|---|
| Prensagem mecânica | Industrial | Baixo consumo de energia; Baixo custo. | Elevado teor de óleo na torta. |
| Extração com hexano ^{1,2} | Laboratorial Industrial | Seletividade do solvente; Estreita faixa de ebulição; Imiscibilidade com água; Recuperação do solvente. | Alto consumo de energia (aquecimento); Inflamabilidade do solvente; Alto custo do solvente; Impacto ambiental. |
| Extração com éter (Soxhlet) ³ | Laboratorial | Baixo ponto de ebulição do solvente; Recuperação do solvente. | Alto consumo de energia (aquecimento); Solvente inflamável e explosivo; Alto custo do solvente; Impacto ambiental. |
| Extração com clorofórmio/metanol (Bligh-Dyer) ⁴ | Laboratorial | Baixo consumo de energia (sem aquecimento); Extração de todas as classes de lipídios. | Solventes tóxicos; Impacto ambiental. |

¹Citado por Moretto e Fett (1998); ²Citado por Paquot (1979); ³Citado por Pregnotatto e Pregnotatto (1985); ⁴Citado por Vicenzi (2004).

Para Colnago (1996), laboratórios podem dispensar a extração por solvente para a determinação rotineira do teor de óleo, especialmente quando grandes

quantidades de amostras precisam ser avaliadas, por se tratar de um processo demorado e destrutivo. De acordo com o autor, a ressonância magnética nuclear

(RMN) é um método alternativo para a determinação do teor de óleo e apresenta vantagens como a rapidez, a preservação da matriz, simplicidade no preparo da amostra e a possibilidade de uso de sistemas *in vivo* para a determinação.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mede a absorção de radiação eletromagnética de até 750MHz pelos núcleos dos átomos, presentes na amostra. O uso da técnica no estado sólido é um campo especializado que abrange desde o estudo de polímeros até a produção de imagens (MENDHAM et al., 2002).

Analisar uma mesma amostra usando diferentes técnicas pode servir para verificar a ordem de grandeza de um resultado ou para confirmar a existência de um analito, obtido pela técnica original. Comparar resultados é uma prática comum à química analítica para verificar a precisão de técnicas distintas e determinar se conjuntos diferentes de dados são coerentes e, portanto, confiáveis (LEITE, 1998). Além disso, Ellison *et al.* (2002) destacam que a atual preferência pelos métodos analíticos oficiais, para a determinação dos mais variados analitos, tem origem na necessidade de apresentar dados com rastreabilidade e precisão. Contudo, a exigência formal de confiabilidade consiste na rastreabilidade do resultado a uma referência que pode ser representada por método reconhecido ou empírico (ELLISON

et al., 2002). O uso da espectroscopia de RMN pressupõe, portanto, a necessidade de estabelecer previamente uma referência para os resultados, como forma de validá-los.

Validar um ensaio laboratorial é comprovar, através de evidência objetiva, que os requisitos para sua aplicação foram atendidos (INMETRO, 2005). Embora a validação não tenha sido formalmente definida, o foco incide sobre a confiabilidade analítica do método, sem desprezar o critério pessoal, quando o interessado promove adaptações e ajusta as recomendações técnicas às suas necessidades (LEITE, 1998).

Leite (1998) destaca que a validação deve ser um processo abrangente que avalie desde a estrutura suporte e o ambiente laboratorial até a capacitação do analista. Neste contexto, deve-se ter especial interesse em parâmetros básicos, como exatidão, precisão, segurança, calibração, respostas analíticas e avaliação estatística.

Entendendo a necessidade de agilidade na geração de resultados, preservação de amostras, redução de riscos operacionais e minimização do impacto ambiental, mas, sobretudo, reconhecendo ser imprescindível a confiabilidade dos resultados gerados em análises laboratoriais, este trabalho objetiva a validação da técnica de determinação do teor de óleo de sementes de mamona, usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Material e métodos

O processo de validação da técnica de espectroscopia de RMN passa pelas etapas de definição da precisão e da exatidão dos resultados, neste caso pela comparação com o método de extração do tipo Soxhlet, usando hexano como solvente, por ser o método oficial de determinação do teor de óleo, de acordo com a IUPAC, *International Union of Pure*

and Applied Chemistry.

Sementes de mamona

As sementes utilizadas na validação da técnica de espectroscopia de RMN foram obtidas de cinco cultivares comerciais de mamona cultivadas na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005-2006 (Tabela 2).

Tabela 2. Procedência das cultivares comerciais de mamona cultivadas em Pelotas, RS, na safra 2005-2006. Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Cultivar | Tipo | Procedência | Descrição |
|-----------|-----------|--------------|--|
| Íris | Híbrido | Janaúba/MG | Sementes Armani |
| IAC 226 | Variedade | Campinas/SP | IAC (Instituto Agronômico de Campinas) |
| Savana | Híbrido | Janaúba/MG | Sementes Armani |
| VINEMA T1 | Variedade | Camaquã/RS | VINEMA (Wilson Neumann Machado) |
| Cafelista | Variedade | São Paulo/SP | CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral) |

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona, utilizando-se a técnica de RMN, foi conduzida a partir de procedimentos descritos por Colnago (1996), na Embrapa Algodão, em três repetições. A primeira etapa desta técnica foi a calibração do espectrômetro de onda contínua de 2,7MHz, usando-se farinha e óleo de mamona, como os pontos zero e 100%, respectivamente. Uma vez realizada a calibração, procedeu-se à determinação do teor de óleo das amostras. Ao final da leitura, o peso de amostra usado no teste foi inserido no sistema e o teor de óleo fornecido automaticamente.

Método de Extração Soxhlet

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona utilizando-se o método Soxhlet com hexano foi realizada, em três repetições, com base nos procedimentos definidos pela IUPAC (PAQUOT, 1979). A fim de se obter a maior fração de extrato possível (produto de peso constante), foram adotados 40 refluxos, totalizando cerca de três horas e trinta minutos de extração, desde o primeiro refluxo. Ao final da extração, o solvente foi recuperado e o teor de lipídios foi determinado pela relação gravimétrica percentual entre o óleo obtido e as sementes submetidas à extração.

Avaliação estatística dos dados

A medida da precisão da técnica instrumental baseou-se na avaliação da variância dos resultados obtidos para cada cultivar testada. Para fazê-lo, foram comparados os dois conjuntos de dados pelo teste F. A exatidão foi medida através da comparação de médias (teste t) dos dados, obtidas pela espectroscopia de RMN e pelo método clássico de extração (Soxhlet) de óleo das sementes.

Resultados e Discussão

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona pelo método Soxhlet de extração por solvente orgânico, usando hexano, forneceu os resultados reunidos na Tabela 3, considerados referência na validação da técnica instrumental (RMN). Os valores de desvio padrão entre 0,34 e 0,51, além de coeficientes de variação que oscilaram entre 0,77 e 1,17% indicam precisão elevada, requisito intrínseco a um método analítico oficial.

Tabela 3. Teor médio de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método de extração Soxhlet usando hexano e pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Cultivar | Método Soxhlet | | | RMN | | |
|-----------|----------------|---------------|--------|--------------|---------------|--------|
| | Teor de óleo | Desvio padrão | CV (%) | Teor de óleo | Desvio padrão | CV (%) |
| Íris | 47,9 | 0,51 | 1,06 | 49,1 | 2,04 | 4,15 |
| IAC 226 | 45,0 | 0,40 | 0,88 | 45,4 | 1,46 | 3,21 |
| Savana | 44,1 | 0,34 | 0,77 | 46,5 | 1,48 | 3,18 |
| VINEMA T1 | 42,6 | 0,42 | 0,98 | 44,0 | 1,81 | 4,12 |
| Cafelista | 40,6 | 0,48 | 1,17 | 42,8 | 1,39 | 3,25 |

A técnica instrumental de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) gerou valores de desvio padrão que oscilaram entre 1,39 e 2,04, e coeficientes de variação, entre 3,21 e 4,24% (Tabela 3), que indicam menor precisão, quando comparada ao método clássico (Soxhlet). Entretanto, a avaliação dos resultados da análise de variância através do teste F permite verificar que não existe diferença

significativa em um nível de confiança de 5%.

Ao avaliar a exatidão da técnica proposta, usando-se o teste t para comparação das médias, percebe-se que também não há diferença significativa entre os valores em nível de confiança de 1%, conforme dados expostos na Tabela 4.

Embora seja possível observar que os valores absolutos obtidos com o uso da técnica de espectroscopia

de RMN foram ligeiramente superiores, os coeficientes de correlação, ao redor de 1, indicam que os teores de óleo de cada cultivar, em ambas as técnicas analíticas, são equivalentes, ratificando a informação gerada pelo teste t. A classificação das cultivares, segundo o teor de óleo, obtida a partir dos resultados de ambas as técnicas analíticas, foi equivalente. O híbrido Íris é o material de maior teor, 47,9 e 49,1%, no método Soxhlet e na

espectroscopia de RMN, respectivamente. As variedades VINEMA-T1 e Cafelista, apresentaram os menores teores entre os materiais avaliados e, embora os valores absolutos de teor de óleo para a variedade IAC-226 e para o híbrido Savana indiquem alternância de posição como segunda e terceira cultivar com maior teor de óleo, tais resultados não diferem estatisticamente em um nível de significância de 5%.

Tabela 4. Dados da avaliação estatística da precisão e da exatidão da técnica de espectroscopia de RMN para a determinação do teor de óleo (% p/p b.s.) em sementes de cultivares comerciais de mamona, usando como referência o método Soxhlet. Embrapa Clima Temperado, 2007.

| Cultivar | Soxhlet | | RMN | | F | t | Correlação |
|-----------|---------|----------------|-------|----------------|--------------------------|-------------------------|------------|
| | Média | s ² | Média | s ² | (F _{5%} =19,00) | (t _{1%} =3,75) | |
| Íris | 47,9 | 0,258 | 49,1 | 4,157 | 16,12 | 1,35 | 1,0000 |
| IAC 226 | 45,0 | 0,157 | 45,4 | 2,121 | 13,53 | 0,65 | 1,0000 |
| Savana | 44,1 | 0,115 | 46,5 | 2,186 | 18,96 | 3,50 | 0,9973 |
| VINEMA T1 | 42,6 | 0,174 | 44,0 | 3,287 | 18,86 | 1,69 | 0,9999 |
| Cafelista | 40,6 | 0,226 | 42,8 | 1,929 | 8,55 | 3,35 | 1,0000 |

Onde:

s² é a variância;

F é o valor de F, obtido pela razão entre as variâncias de cada técnica de determinação;

F_{5%}= 19,00 é valor tabelado para $\alpha = 0,05$;

t é valor t obtido da comparação das médias;

t_{1%}= 3,75 é valor tabelado para $\alpha = 0,01$.

Conclusões

O uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) permite determinar, com precisão, o teor de óleo em sementes de mamona.

A espectroscopia de RMN e o método oficial, de extração tipo Soxhlet com hexano, produzem resultados equivalentes na determinação do teor de óleo em sementes de mamona.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS) e à Embrapa Algodão (CNPA), pelo apoio na realização deste trabalho.

Referências

- CHRISTIE, W.W. **Advances in Lipid Methodology**. Dundee: Oil Press, 1993. p. 195-213.
- COLNAGO, L.A. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1996. 13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular técnica, 3).
- ELLISON, S.L.R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **Guia EURACHEM/CITAC: determinando a incerteza na medição analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2002. 166 p.
- HOSENEY, R.C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991. 317 p.
- INMETRO. **Orientações para seleção e uso de materiais de referência: DQO-CGCRE-016**. Revisão 00. Rio de Janeiro: INMETRO-DICLA, 2005. 15 p.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. 3 ed. Campinas: Átomo, 1998. 224 p.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 151 p.
- PAQUOT, C. **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. 6.ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170 p.
- PREGNOLATO, W; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde, 1985. v. 1. 533 p.
- VICENZI, R. **Apostila de bromatologia**. Ijuí: Ed. Da UNIJUI - Departamento de Ciências da Saúde, 2004. 79 p.

**Comunicado
Técnico, 153**

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 3275-8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão 2006: 50 exemplares

**Comitê de
publicações**

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia

Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena

Vernetti Azambuja, Luís Antônio Suíta de Castro.

Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo

Corrêa Antunes

Revisão de texto: Sadi Sapper

Normalização bibliográfica: Regina das Graças

Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

Expediente