

ESTUDO INTERLABORATORIAL DE ANÁLISE DE SEMENTES DE URUCUM

RESULTADO DA VALIDAÇÃO DA AMOSTRA DE CORANTE

1. Amostragem

Uma amostra de corante obtido pela precipitação ácida dos pigmentos extraídos de sementes de urucum com solução alcalina, portanto composto predominantemente por norbixina, foi sub-amostrada em frações de aproximadamente 5g e envasada em frascos de vidro de 12ml com tampa de polipropileno, recoberto com papel alumínio para proteção da luz. As amostras foram identificadas com a seguinte codificação: **EI-C0717-NN**, onde **NN** é uma numeração seqüencial que identifica cada amostra individualmente.

Para os ensaios de validação da amostra foram separados ao acaso as seguintes embalagens: 02, 21, 49, 52, 25, 26, 29, 36, 19 e 48. A embalagem 52 foi utilizada para o estudo de homogeneidade intra-embalagem.

2. Validação das amostras

Para avaliação estatística da homogeneidade quanto aos carotenóides totais expressos como bixina ou norbixina foi realizada a análise de variância de resultados analíticos obtidos de ensaios em duplicatas, independentes e simultâneas, das dez amostras e de cinco repetições analíticas da mesma embalagem (55).

Para efeito de aprovação do estudo de homogeneidade dentro de cada embalagem de corante de urucum foi estabelecido como aceitável o coeficiente de variação menor ou igual ao coeficiente de variação obtido pela equação de HORWITZ¹. Para a avaliação de valores discrepantes (outliers) os resultados foram avaliados pelo teste de Dixon e a distribuição normal foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

3 Metodologia analítica

3.1 Objetivo

Determinação de carotenóides totais, expressos como bixina ou norbixina, em corante (norbixina) obtido pela precipitação ácido de extratos alcalinos dos pigmentos extraídos de sementes de urucum.

¹ $CV_{max} (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$, onde **C** é a concentração estudada expressa como potência de 10 (Ex. % ou g/100g = 10^{-2}).

3.2 Princípio do método

O método analítico baseia-se na diluição do sal de norbixina com solução alcalina de KOH e quantificação espectrofotométrica utilizando o coeficiente de absorção.

3.3 Materiais

- Espátulas.
- Bequer de 5mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL ou pipetador.
- Balões volumétricos de 25 mL e 100 mL.

3.4 Equipamentos

- Balança semi-analítica.
- Espectrofotômetro UV/VIS.
- Estufa de aquecimento com ventilação forçada.

3.5 Reagente

- Hidróxido de potássio p.a.

3.6 Soluções

- Solução de hidróxido de potássio 0,5%. Pesar 5 g de hidróxido de potássio p.a. e diluir para 1000 mL com água deionizada.

3.7 Procedimento analítico

Pesar uma massa de aproximadamente 0,02g do corante em um bequer de 5mL. Transferir quantitativamente o corante para um balão volumétrico de 100mL, utilizando uma solução de hidróxido de potássio 0,5% (m/v). Completar o volume com o KOH 0,5%. Agitar vigorosamente e levar à estufa previamente aquecida a $40^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Deixar sob aquecimento por 30 minutos. Retirar e deixar esfriar a temperatura ambiente. Se necessário complete o volume com a solução de KOH 0,5%. Agitar bem. Transferir uma alíquota de 1 mL para um balão de 25mL e complete o volume com solução de hidróxido de potássio 0,5%. Agitar bem. Realizar leitura no espectrofotômetro à 453 nm utilizando solução de hidróxido de potássio 0,5% como referência. Se necessário, realizar outra diluição para que a leitura da absorbância fique entre 0,3 e 0,7 unidades de absorbância.

3.8 Cálculos

Utilizar a equação apresentada a seguir para calcular a concentração de carotenóides totais expressos como norbixina.

$$C_{(g/100g)} = \frac{A \cdot D}{E_{1cm}^{1\%} \cdot m}$$

onde:

C = Concentração de carotenóides totais expressos como norbixina (g/100g);

A = Absorbância da amostra;

D = Diluição da amostra (ex: 100ml → 1mL : 25mL → **D** = 2.500;

E_{1cm}^{1%} = Coeficiente de absorção (2850 → para norbixina em solução aquosa de NaOH a 453nm);

m = massa da amostra (g).

Para converter o resultado para carotenóides totais, expressos como bixina, o valor deve ser dividido por 1,16.

4. Resultados

Os resultados das análises de carotenóides totais nas amostras de corante de urucum (norbixina) utilizadas como referência estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Resultados das análises de carotenóides totais expressos como norbixina e bixina em uma das embalagens de corante utilizadas nesse estudo. Resultados de cinco determinações simultâneas e independentes em amostras de uma mesma embalagem.

Amostragem	Norbixina	Bixina
	(g/100g)	(g/100g)
	Embalagem 52	Embalagem 52
1	35,93	30,97
2	36,50	31,46
3	37,06	31,94
4	36,20	31,21
5	36,64	31,59
Média	36,47	31,44
s	0,43	0,37
CV(%)	1,18	1,18

s = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%).

Estabelecemos como incerteza aceitável a estimativa de um desvio padrão com valor igual ou inferior ao coeficiente de variação (CV%) estabelecido pela equação de HORWITZ para a concentração carotenoides totais expressos como bixina ou norbixina, obtida na análise da amostra de corante utilizada nesse estudo (Tabela 2), ou seja:

- carotenoides totais expressos como norbixina $\rightarrow s \leq 0,85 \text{ g/100g}$;
- carotenoides totais expressos como bixina $\rightarrow s \leq 0,75 \text{ g/100g}$;

Os resultados dentro das mesmas embalagens apresentaram estimativa de desvio padrão inferior ao calculado pela equação de HORWITZ (carotenoides totais expressos como norbixina $\rightarrow s \leq 0,43 \text{ g/100g}$; carotenoides totais expressos como bixina $\rightarrow s \leq 0,37 \text{ g/100g}$). Portanto a amostra de referência de corante de urucum foi considerada homogênea dentro das embalagens para a determinação de carotenoides totais expressos como norbixina e/ou bixina.

TABELA 2. Resultados das análises de carotenoides totais expressos como norbixina e bixina entre as embalagens de corante utilizadas nesse estudo. Resultados é média aritmética de duas determinações simultâneas e independentes em amostras de dez embalagens escolhidas ao acaso.

Embalagens	Norbixina (g/100g)				Bixina (g/100g)			
	A	B	$\bar{x}$	s	A	B	$\bar{x}$	s
02	36,26	37,25	36,76	0,70	31,26	32,11	31,69	0,60
19	36,89	36,73	36,81	0,11	31,80	31,67	31,74	0,10
21	36,18	38,07	37,13	1,34	31,19	32,82	32,00	1,15
25	35,64	37,19	36,42	1,10	30,73	32,06	31,39	0,94
26	36,14	37,07	36,61	0,66	31,15	31,95	31,55	0,57
29	36,09	33,76	34,93	1,65	31,12	29,10	30,11	1,42
36	37,55	36,81	37,18	0,52	32,37	31,74	32,05	0,45
48	37,10	37,14	37,12	0,03	31,98	32,02	32,00	0,02
49	36,89	36,37	36,63	0,37	31,81	31,35	31,58	0,32
52	36,20	36,64	36,42	0,31	31,21	31,59	31,40	0,27
Média	36,60				31,55			
s	0,65				0,56			
CV(%)	1,78				1,78			

$\bar{x}$ = Média aritmética; s = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%).

O teste de Kolmogorov-Smirnov indicou que os resultados das análises das amostras estão normalmente distribuídos e o teste de Dixon indicou que não há *outlier* entre esses valores.

A Tabela 3 apresenta as análises de variância dos resultados de carotenoides totais expressos como norbixina (a) e bixina (b) para as embalagens de corante utilizadas nesse estudo.

TABELA 3. Análise de variância dos resultados obtidos para a concentração de carotenoides totais expressos como norbixina (a) e bixina (b) entre as embalagens de corantes utilizadas nesse estudo.

a) Carotenoides totais expressos como norbixina

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F crítico</i>
Entre Embalagens	7,6474	9	0,84971	1,10428	3,178893
Análise	0,2184	1	0,2184	0,28384	5,117355
Erro	6,92525	9	0,76947		
Total	14,7911	19			

b) Carotenoides totais expressos como bixina

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F crítico</i>
Entre Embalagens	5,68538	9	0,63171	1,10491	3,178893
Análise	0,16037	1	0,16037	0,28051	5,117355
Erro	5,14554	9	0,57173		
Total	10,9913	19			

As Análises de Variância indicaram que, para o nível de significância de 5%, não há evidências de diferenças significativas na concentração de carotenóides totais expressos como norbixina ou como bixina entre as embalagens de corantes e entre as repetições analíticas realizadas. Portanto as amostras foram consideradas homogêneas para a determinação de carotenoides totais expressos como norbixina ou como bixina nas embalagens de corante utilizadas como referência.