

## ESTUDO INTERLABORATORIAL DE ANÁLISE DE SEMENTES DE URUCUM

### RESULTADO DA VALIDAÇÃO DA AMOSTRA DE SEMENTES DE URUCUM

#### 1. Amostragem

Uma amostra de 5 kg sementes de urucum da “variedade” *Piave*, da safra de 2016, armazenada sob vácuo, foi obtida de junto a uma empresa de corantes localizada no Estado de São Paulo. A amostra foi previamente limpa com a retirada parcial de impureza por catação manual. Em seguida a amostra foi homogeneizada e *subamostrada* em parcelas de aproximadamente 50g. Essas subamostras foram envasadas sob vácuo em uma embalagem de filme laminado a base de poliéster, alumínio e polipropileno, com taxa de permeabilidade ao oxigênio inferior a 0,005mL/m<sup>2</sup>/dia. As amostras foram identificadas com a seguinte codificação: **EI-U0717-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: 7, 12, 25, 28, 39, 47, 56, 68, 71 e 76. A embalagem 55 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.

Foi estabelecido como aceitável, para o estudo de homogeneidade entre as embalagens de sementes de urucum usadas como referência, o coeficiente de variação menor ou igual a duas vezes o coeficiente de variação obtido pela equação de HORWITZ<sup>1</sup>. Para a avaliação de valores discrepantes (outliers) os resultados foram avaliados pelo teste de Dixon e a distribuição normal dos valores encontrados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

---

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

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemists*, v. 54, n. 1, p. 67 – 76, 1982.

### **3 Metodologia analítica**

#### **3.1 Objetivo**

Determinação de carotenóides totais expressos como bixina ou norbixina, em sementes de urucum.

#### **3.2 Princípio do método**

O método analítico baseia-se na saponificação da bixina em sal de norbixina com solução alcalina de óleo de mamona, diluição em solução de hidróxido de potássio e detecção e quantificação espectrofotométrica utilizando o coeficiente de absorção da norbixina.

#### **3.3 Materiais**

- Erlenmeyer de 300 mL.
- Barra magnetica (“peixinho” para agitador magnético).
- Espátulas.
- Pipetas volumétricas de 1 mL ou pipetador.
- Balões volumétricos de 10 mL e 100 mL.

#### **3.4 Equipamentos**

- Balança semi-analítica.
- Agitador magnético.
- Espectrofotômetro UV/VIS.
- Chapa de aquecimento.

#### **3.5 Reagente**

- Óleo de mamona puro (óleo de rícino).
- Hidróxido de potássio p.a.

#### **3.6 Soluções**

- Solução de hidróxido de potássio 45%. Pesar 45 g de hidróxido de potássio p.a. e diluir para 100 mL com água deionizada.
- Solução de hidróxido de potássio 0,5%. Pesar 5 g de hidróxido de potássio p.a. e diluir para 1000 mL com água deionizada.

- Solução de óleo de mamona (“Solução de extração - estoque”). Misturar 300 mL de óleo de mamona com 100 mL de hidróxido de potássio 45% e 200 mL de água deionizada. Aquecer em chapa de aquecimento até a ebulição. Deixar em ebulição por 5 minutos agitando ocasionalmente. (Obs. A solução passará de opaca para uma solução clara). Após isso retirar da chapa e deixar resfriar naturalmente.
- “Solução de extração - trabalho”. Misturar 50 mL de solução de extração – estoque com 150 mL de solução de hidróxido de potássio 45% e completar para 1L com água deionizada. Essa será a solução utilizada no procedimento analítico.

### 3.7 Procedimento analítico

Pesar e anotar a massa do erlenmeyer de 300 mL vazio. Transferir 10g ± 2g de sementes de urucum inteiras para erlemeyer de 300 mL e anotar a massa do erlemeyer com as sementes (*Massa A*). Adicionar 60 mL da “solução de extração - trabalho” e aquecer em chapa de aquecimento até ebulição agitando o erlenmeyer ocasionalmente. Manter em ebulição por cerca de um minuto. Esfriar a temperatura ambiente. Adicionar água destilada ao extrato até que a massa seja aproximadamente o valor da *Massa A* + 250g. Anotar a massa final. (Essa massa, subtraída da *Massa A*, será utilizada como valor da primeira diluição). Agitar em agitador magnético por 10 minutos. Transferir uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com solução de hidróxido de potássio 0,5%. Agitar bem. Rediluir 1 mL da solução anterior para um balão de 10mL com solução de hidróxido de potássio 0,5% e agitar bem. Realizar leitura da última diluição no espectrofotômetro à 453 nm, utilizando a 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 0,5%, 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 sementes de urucum 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 sementes de urucum utilizadas nesse estudo. Resultados de cinco determinações simultâneas e independentes em amostras de uma mesma embalagem.

Amostragem	Norbixina	Bixina
	(g/100g)	(g/100g)
	Embalagem 55	Embalagem 55
1	4,57	3,94
2	5,01	4,32
3	4,80	4,14
4	4,45	3,84
5	4,85	4,18
Média	4,74	4,08
s	0,23	0,19
CV(%)	4,77	4,77

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

Como a amostragem de sementes de urucum apresenta dificuldade de homogeneidade, estabelecemos como incerteza aceitável a estimativa de desvio padrão igual ou inferior a duas vezes o coeficiente de variação estabelecido pela equação de HORWITZ para a concentração carotenoides totais expressos como bixina ou norbixina obtida nesse estudo (Tabela 5), ou seja:

- carotenoides totais expressos como norbixina →  $s \leq 0,30$  g/100g;
- carotenoides totais expressos como bixina →  $s \leq 0,27$  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 →  $s = 0,23$ ; carotenoides totais expressos como bixina →  $s = 0,19$ ). Portanto as amostras de referência de sementes de urucum foram consideradas homogêneas dentro das embalagens, para a determinação de carotenóides totais expressos como norbixina e/ou bixina.

TABELA 2. Resultados das análises de carotenoides totais expressos como norbixina e bixina nas embalagens 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
7	4,93	4,64	4,79	0,20	4,25	4,00	4,13	0,17
12	5,13	5,03	5,08	0,07	4,42	4,34	4,38	0,06
25	4,49	4,29	4,39	0,14	3,87	3,69	3,78	0,12
28	4,92	4,84	4,88	0,06	4,24	4,17	4,20	0,05
39	4,60	4,46	4,53	0,10	3,96	3,84	3,90	0,08
47	4,91	4,61	4,76	0,21	4,23	3,98	4,10	0,18
56	4,49	4,76	4,63	0,19	3,87	4,10	3,99	0,16
68	5,01	4,69	4,85	0,23	4,32	4,04	4,18	0,19
71	5,00	5,33	5,17	0,23	4,31	4,60	4,45	0,20
76	4,47	4,95	4,71	0,34	3,86	4,27	4,06	0,29
Média		4,78				4,12		
s		0,27				0,23		
CV(%)		5,63				3,23		

$\bar{x}$  = 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 a análise de variância dos resultados de carotenoides totais expressos como norbixina (a) e bixina (b) para as embalagens de sementes de urucum utilizadas nesse estudo.

TABELA 3. Análises de variância para os resultados obtidos para a concentração de carotenoides totais expressos como norbixina e bixina entre as embalagens de sementes de urucum 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	0,994077	9	0,110453	2,651123	3,178893
Analise	0,005952	1	0,005952	0,142854	5,117355
Erro	0,374964	9	0,041663		
Total	1,374993	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	1,33638	9	0,148487	2,658934	3,178893
Analise	0,008	1	0,008	0,71384	5,117355
Erro	0,5026	9	0,055844		
Total	1,84698	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 sementes de urucum 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 sementes de urucum utilizadas como referência.