



**ESTUDO INTERLABORATORIAL DE
ANÁLISE DE SEMENTES DE
URUCUM**



**ESTUDO INTERLABORATORIAL DE ANÁLISES DE CAROTENOIDES TOTAIS
EM SEMENTES DE URUCUM**

RELATÓRIO FINAL

Coordenador

Paulo Roberto Nogueira Carvalho

SETEMBRO 2017

Sumário

1. OBJETIVO	1
2. PLANO DE TRABALHO	1
3. AMOSTRA DE REFERÊNCIA	1
3.1 Amostras de corante	1
3.2 Amostras de sementes	2
3.3 Identificação das amostras	3
3.4 Estudo de homogeneidade das amostras de referência	3
3.4.1 Corante de urucum	3
3.4.2 Sementes de urucum	4
4. METODOLOGIA ANALÍTICA	4
4.1 Carotenoides totais expressos como bixina/norbixina em sementes de urucum	4
4.1.1 Objetivo	4
4.1.2 Princípio do método	4
4.1.3 Materiais	4
4.1.4 Equipamentos	5
4.1.5 Reagentes	5
4.1.6 Soluções	5
4.1.7 Procedimento analítico	5
4.1.8 Cálculos	6
4.2 Carotenoides totais expressos como bixina/norbixina em corante (norbixina) de urucum	6
4.2.1 Objetivo	6
4.2.2 Princípio do método	6
4.2.3 Materiais	6
4.2.4 Equipamentos	7
4.2.5 Reagentes	7
4.2.6 Soluções	7
4.2.7 Procedimento analítico	7
4.2.8 Cálculos	7

5.	RESULTADOS	8
5.1	Resultados dos ensaios das amostras de referência	8
5.1.1	Resultados do estudo de homogeneidade das amostras de referência do corante de urucum	8
5.1.2	Resultados do estudo de homogeneidade das amostras de referência de sementes de urucum	10
6.	ESTUDO INTERLABORATORIAL	12
6.1	Laboratórios participantes do estudo	12
6.2	Encaminhamento das amostras	13
6.3	Princípios dos métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes	14
6.4	Resultados apresentados pelos laboratórios participantes	14
6.5	Avaliação estatística dos resultados (como carotenoides totais expressos como norbixina)	15
7.	CONCLUSÕES	18
8.	OBSERVAÇÃO	19
9.	BIBLIOGRAFIA	20

ESTUDO INTERLABORATORIAL DE ANÁLISES DE CAROTENOIDES TOTAIS EM SEMENTES DE URUCUM

Relatório Final

1. OBJETIVO

Esse estudo tem como objetivo a comparação do desempenho dos laboratórios participantes na análise de carotenoides totais, expressos como bixina ou norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana L*). Seus resultados não devem ser utilizados para a aprovação ou rejeição da metodologia analítica empregada pelos laboratórios participantes do estudo e nem deve ser interpretados como um ensaio de proficiência ou como certificação de amostra.

2. PLANO DE TRABALHO

O plano de trabalho desse estudo interlaboratorial obedece as seguintes etapas:

1. Cadastro dos laboratórios participantes
- 2 - Aquisição de amostra de sementes de urucum e corante a ser utilizado no estudo;
- 2 - Preparo e envase das amostras;
- 3 - Estudo de homogeneidade das amostras intra-embalagem e entre as embalagens;
- 4 - Distribuição das amostras de corante e de sementes entre os laboratórios participantes;
- 5 - Recepção e análise estatística dos resultados recebidos;
- 6 - Divulgação dos resultados.

3. AMOSTRAS DE REFERÊNCIA

3.1 Amostras de corante

A amostra de corante foi representada majoritariamente por norbixina obtida pela precipitação ácida dos pigmentos extraídos das sementes de urucum utilizando soluções alcalinas. A amostra foi homogeneizada, subamostrada e embaladas em frascos de vidro com batoque e tampa de polipropileno e revestida com papel alumínio (Figura 1).



FIGURA 1. Amostra de corante de urucum utilizada como referência

3.2 Amostras de sementes

Uma amostra de 5 kg sementes de urucum da “variedade” *Piave*, da safra de 2016, armazenada sob vácuo, foi obtida 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/m²/dia (Figura 2).



FIGURA 2. Amostra de sementes de urucum utilizada como referência.

3.3 Identificação das amostras

Cada uma das amostras foi rotulada e identificada individualmente conforme apresentado a seguir: Sementes de urucum “**EI-U0717-NN**”; Corante de urucum “**EI-C0717-NN**”; onde “**NN**” é uma numeração sequencial que identifica cada amostra individualmente.



Etiqueta das sementes de urucum



Etiqueta do corante de urucum

3.4 Estudo de homogeneidade das amostras de referência

3.4.1 Corante de urucum

Para a avaliação estatística da homogeneidade das amostras de referência de corante de urucum quanto à concentração de carotenoides totais expresso como bixina ou norbixina foi realizada a análise de variância de resultados analíticos obtidos de ensaios em duplicatas, independentes e simultâneas, de dez amostras coletadas ao acaso (homogeneidade entre as embalagens) e de cinco repetições analíticas de uma mesma embalagem (homogeneidade dentro da embalagem). Para isso foram selecionadas (ao acaso) as seguintes amostras: homogeneidade entre embalagens = 02, 21, 49, 52, 25, 26, 29, 36, 19 e 48; homogeneidade dentro da embalagem = 52.

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 HORWITZ. Para a avaliação de valores discrepantes (outliers) os resultados foram avaliados pelo teste de Dixon e a distribuição normal dos valores foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

3.4.2 Sementes de urucum

Para a avaliação estatística da homogeneidade das amostras de referência de sementes de urucum quanto à concentração de carotenoides totais expresso como bixina ou norbixina foi realizada a análise de variância dos resultados analíticos obtidos de ensaios em duplicatas, independentes e simultâneas, de dez amostras coletadas ao acaso (homogeneidade entre as embalagens) e de cinco repetições analíticas de uma mesma embalagem (homogeneidade dentro da embalagem). As amostras utilizadas foram as seguinte: homogeneidade entre as embalagens = 7, 12, 25, 28, 39, 47, 56, 68, 71 e 76; homogeneidade dentro da embalagem = 55.

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 HORWITZ¹. 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.

4. METODOLOGIA ANALÍTICA.

4.1 Carotenoides totais expressos como bixina ou norbixina em sementes de urucum

4.1.1 Objetivo

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

4.1.2 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.

4.1.3 Materiais

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

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}).

² YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Determinação de Bixina em sementes de urucum. Estudo

4.1.4 Equipamentos

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

4.1.5 Reagentes

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

4.1.6 Soluções

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

4.1.7 Procedimento analítico

Pesar e anotar a massa do erlenmeyer de 300 mL vazio. Transferir $10g \pm 2g$ de sementes de urucum inteiras para erlenmeyer de 300 mL e anotar a massa do erlenmeyer 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.

4.1.8 Cálculos

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

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

onde:

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

A = Absorbância da amostra;

D = Diluição da amostra (ex: 250ml → 1mL : 100mL → 1mL : 10mL = 250x100x10 → **D** = 250.000;

E_{1cm}^{1%} = Coeficiente de absorção (2850 → para norbixina em solução aquosa de KOH 0,5% a 453nm);

m = massa da amostra (g).

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

4.2 Carotenoides totais expressos como bixina/norbixina em corante (norbixina) de urucum em pó.

4.2.1 Objetivo

Determinação de carotenoides totais expressos como bixina ou norbixina em corante em pó (norbixina) obtido pela precipitação ácido dos pigmentos extraídos de sementes de urucum com soluções alcalinas.

4.2.2 Princípio do método

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

4.2.3 Materiais

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

4.2.4 Equipamentos

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

4.2.5 Reagentes

- Hidróxido de potássio p.a.

4.2.6 Soluções

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

4.2.7 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°C ± 10°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 absorvância fique entre 0,3 e 0,7 unidades de absorvância.

4.2.8 Cálculos

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

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

onde:

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

A = Absorvância 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 KOH a 453nm);

m = massa da amostra (g).

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

5. RESULTADOS

5.1 Resultados dos ensaios das amostras de referência.

5.1.1 Resultados do estudo de homogeneidade das amostras de referência do corante de urucum.

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

TABELA 1. Resultados das análises de carotenoides 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 → $s \leq 0,85$ g/100g;
- carotenoides totais expressos como bixina → $s \leq 0,75$ 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 → $s \leq 0,43$ g/100g; carotenoides totais expressos como bixina → $s \leq 0,37$ 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.

As Análises de Variância indicaram que, para o nível de significância de 5%, não há evidências de diferenças significativas na concentração de carotenoides 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.

TABELA 3. Análise de variância dos resultados obtidos para a concentração de carotenoides totais expressos como norbixina e bixina 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
Analise	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
Analise	0,16037	1	0,16037	0,28051	5,117355
Erro	5,14554	9	0,57173		
Total	10,9913	19			

5.1.2 Resultados do estudo de homogeneidade das amostras de referência de sementes de urucum.

Os resultados das análises de carotenoides totais nas amostras de sementes de urucum utilizadas como referência estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4. Resultados das análises de carotenoides 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 $\rightarrow s \leq 0,30 \text{ g/100g}$;
- carotenoides totais expressos como bixina $\rightarrow s \leq 0,27 \text{ g/100g}$;

Os resultados dentro das mesmas embalagens apresentaram estimativa de desvio padrão inferior ao calculado pela equação de HORWITZ (carotenoides totais expressos como norbixina $\rightarrow s = 0,23$; carotenoides totais expressos como bixina $\rightarrow s = 0,19$). Portanto as amostras de referência de sementes de urucum foram consideradas homogêneas dentro das embalagens, para a determinação de carotenoides totais expressos como norbixina e/ou bixina.

TABELA 5. 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 (%).

A Tabela 6 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 6. 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 carotenoides 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.

6. ESTUDO INTERLABORATORIAL

6.1 Laboratórios participantes do estudo

Sete laboratórios participaram do estudo preenchendo o formulário disponibilizado no site www.ourucum.com.br. Três laboratórios solicitaram que sua identificação não fosse divulgada. Os outros quatro laboratórios participantes estão apresentados a seguir em ordem alfabética:

- **INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Av. Brasil, 2880

Campinas – SP

CEP: 13070-178

Responsável: Marta Gomes da Silva

- **NEW MAX INDUSTRIAL**
Rua do Marceneiro, 159-179
Americana – SP
CEP: 13478-722
Responsável: Bruna Duarte
- **SENSIENT TECHNOLOGIES BRASIL**
Av. Benedito Quina da Silva, 550
Jundiaí – SP
CEP: 13212-141
Responsável: Wilson Onório
- **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**
Av. Costa e Silva – S/N
Campo Grande – MS
CEP: 79070-900
Responsável: Lincoln Carlos Silva de Oliveira

Todos os laboratórios participantes foram aleatoriamente identificados utilizando numeração sequencial de 1 a 7, antecedida da terminologia LAB.

6.2 Encaminhamento das amostras

Os laboratórios participantes foram orientados sobre a amostragem por meio de correspondência enviada por email (com cópia junto à amostra) com a seguinte recomendação:

“Prezados participantes,

Estamos encaminhando as amostras de sementes e corante de urucum que serão utilizadas como referência no estudo interlaboratorial de análises de carotenoides totais expressos como norbixina ou bixina em sementes de urucum. As amostras compreendem duas embalagens com aproximadamente 50g de sementes de urucum identificadas da seguinte forma: EI-U0717-“NN”, e um frasco com corante de urucum (norbixina), identificado como EI-C0717-NN onde, em ambos os casos, “NN” corresponde ao número de controle das amostras que vocês estão recebendo. As duas embalagens de sementes de urucum devem ser consideradas como uma única amostra, portanto a subamostragem pode ser feita em uma única embalagem ou na mistura das embalagens.

A amostra de referência de corante de urucum (norbixina) tem valor conhecido que pode ser obtido no seguinte endereço: www.ourucum.com.br/interlaboratorial.

Os resultados individuais de três repetições analíticas expressos em “*gramas de carotenoides totais expressos como bixina*” - ou “*norbixina*” por 100g de amostra e, se possível, a metodologia utilizada, deverão ser enviados por e.mail, para carvalho@ital.sp.gov.br. O prazo para o envio dos resultados é de 30 dias decorridos a partir do recebimento das amostras. Favor confirmar o recebimento das amostras pelo mesmo e.mail (carvalho@ital.sp.gov.br).

Os dados sobre o preparo e a validação do material de referência podem ser obtidos no site www.ourucum.com.br/interlaboratorial

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que forem necessários.”

6.3 Princípios dos métodos analíticos utilizados pelos laboratórios participantes

Foi solicitado aos laboratórios participantes que informassem o princípio da metodologia analítica utilizada para a determinação de carotenoides totais expressos como norbixina ou bixina.

Dentre as metodologias informadas a maioria utilizou basicamente o método descrito nesse relatório e utilizado para validação das amostras de referência. Contudo foi informado ainda o uso, por um dos laboratórios participantes, do método descrito por YABIKU & TAKAHASHI, 1992², que tem como princípio a extração com acetona dos pigmentos de sementes previamente trituradas, leitura espectrofotométrica a 480 nm e utilização de um coeficiente de absorção igual a 2826. Foi observado também o uso por um dos laboratórios participantes de leitura dos pigmentos em solução de KOH 0,5% a um comprimento de ondas de 482nm e utilização de um coeficiente de absorção igual a 2870.

6.4 Resultados apresentados pelos laboratórios participantes

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados encaminhados pelos laboratórios. Foi utilizado o Fator 1,16 para a interconversão dos valores de carotenoides totais expressos como norbixina para carotenoides totais expressos como bixina. Os asteriscos (*) após as codificações dos laboratórios nas Tabelas 7 e 8 indicam a unidade em que os resultados foram expressos pelos laboratórios participantes. Um asterisco (*) indica que o resultado foi expresso em norbixina e dois asteriscos (**) indica que o resultado foi expresso em bixina. Alguns laboratórios expressaram nas duas formas (norbixina e bixina), por isso seus resultados aparecem codificados com um e dois asteriscos.

² YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Determinação de Bixina em sementes de urucum. Estudo colaborativo. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 52, p. 31-36, 1992.

Os resultados foram avaliados como carotenoides totais expressos como norbixina, mas uma avaliação como carotenoides totais expressos como bixina não altera significativamente as conclusões apresentadas.

TABELA 7. Resultados encaminhados pelos laboratórios participantes, em carotenoides totais expressos como norbixina.

Carotenoides totais expressos como norbixina (g/100g)							
	LAB 1*	LAB 2	LAB 3*	LAB 4	LAB 5*	LAB 6	LAB 7*
A	4,23	4,51	5,77	5,83	4,42	5,68	5,31
B	4,12	4,67	5,44	6,13	4,82	5,68	5,25
C	4,14	4,11	5,27	5,79	4,51	5,59	5,26
\bar{x}	4,16	4,43	5,49	5,92	4,58	5,65	5,27
s	0,06	0,29	0,25	0,18	0,21	0,05	0,03
CV(%)	1,41	6,61	4,63	3,08	4,58	0,95	0,61

\bar{x} = Média aritmética; s = Estimativa de desvio padrão; CV(%) = Coeficiente de Variação

TABELA 8. Resultados encaminhados pelos laboratórios participantes, em carotenoides totais expressos como bixina.

Carotenoides totais expressos como bixina (g/100g)							
	LAB 1	LAB 2**	LAB 3**	LAB 4**	LAB 5**	LAB 6**	LAB 7**
A	3,65	3,89	4,97	5,03	3,81	4,90	4,58
B	3,55	4,03	4,69	5,28	4,15	4,90	4,52
C	3,57	3,54	4,55	4,99	3,89	4,82	4,53
\bar{x}	3,59	3,82	4,74	5,10	3,95	4,87	4,54
s	0,05	0,25	0,21	0,16	0,18	0,05	0,03
CV(%)	1,41	6,61	4,51	3,08	4,50	0,95	0,71

\bar{x} = Média aritmética; s = Estimativa de desvio padrão; CV(%) = Coeficiente de Variação

6.5 Avaliação estatística dos resultados (como carotenoides totais expressos como norbixina)

Os valores recebidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e os resultados confirmaram a hipótese de distribuição normal do conjunto de valores apresentados pelos laboratórios participantes. Foi também realizado o teste de Dixon que indicou ausência de *outlier* entre estes valores.

Como a metodologia utilizada na validação da amostra de referência não apresenta garantia de exatidão, os resultados dos laboratórios foram comparados com o valor que convencionamos como verdadeiro (4,78 g/100g) e com a média do conjunto de dados de todos os laboratórios participantes (5,07 g/100g). Para ambas as comparações foram utilizadas as concentrações de carotenoides totais expressos como norbixina. Quando o Laboratório apresentou o resultado apenas como bixina, esse valor foi transformado para norbixina utilizando um fator de 1,16.

A Figura 3 apresenta a média e o intervalo de confiança (95%) dos resultados apresentado pelos laboratórios participantes do estudo. Esses valores foram comparados com a média do conjunto dos resultados desses laboratórios (5,07 g/100g - tomado como ponto central) e dois desvios padrões obtidos pelo uso da equação de HORWITZ (0,32 g/100g - tomados como dispersão dos resultados). A Figura 4 apresenta esse mesmo tipo de gráfico tomando como ponto central o valor que convencionamos como verdadeiro (4,78 g/100g) e dois desvios padrões obtidos pelo uso da equação de HORWITZ (0,30 g/100g) tomado como dispersão dos resultados.

A Figura 5 apresenta o gráfico de Z-Score para os laboratórios participantes, utilizando como referência a média do conjunto dos resultados recebidos dos laboratórios participantes (5,07 g/100g). A Figura 6 apresenta esse mesmo tipo gráfico tomando referência o valor que convencionamos como verdadeiro (4,78 g/100g). Para o cálculo do Z-Score foi utilizada a estimativa de dois desvios padrão estabelecida como aceitável para o estudo. Os resultados de Z-Score devem ser interpretados como:

- $|z| \leq 2 \rightarrow$ Desempenho satisfatório
- $2 < |z| < 3 \rightarrow$ Desempenho questionável
- $|z| \geq 3 \rightarrow$ Desempenho insatisfatório

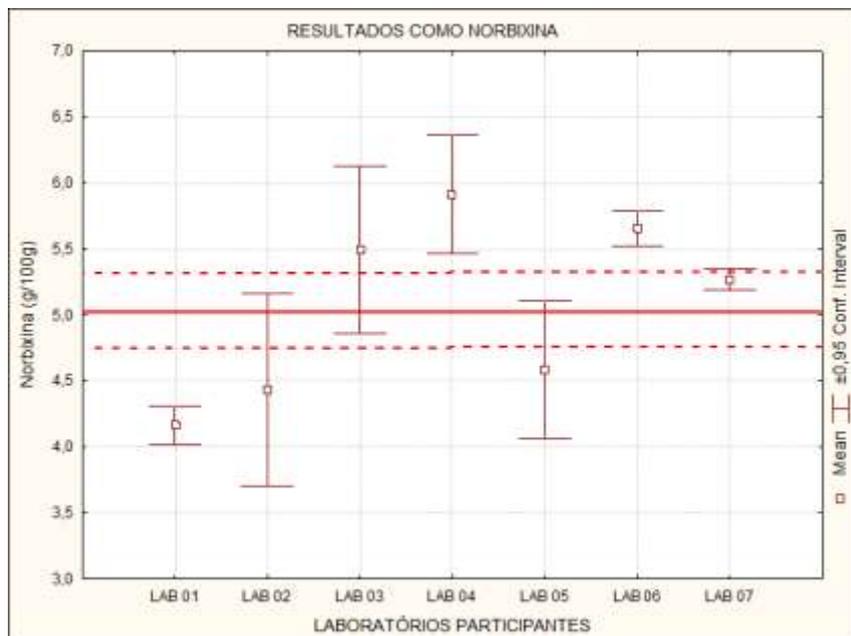


FIGURA 3. Média e o intervalo de confiança (95%) dos resultados das análises de carotenoides totais expressos como norbixina apresentados pelos laboratórios participantes do estudo. A linha sólida representa a media dos valores recebidos (5,07 g/100g) e a linha tracejada dois desvios padrões obtidos pela equação de HORWITZ ($\pm 0,32$ g/100g).

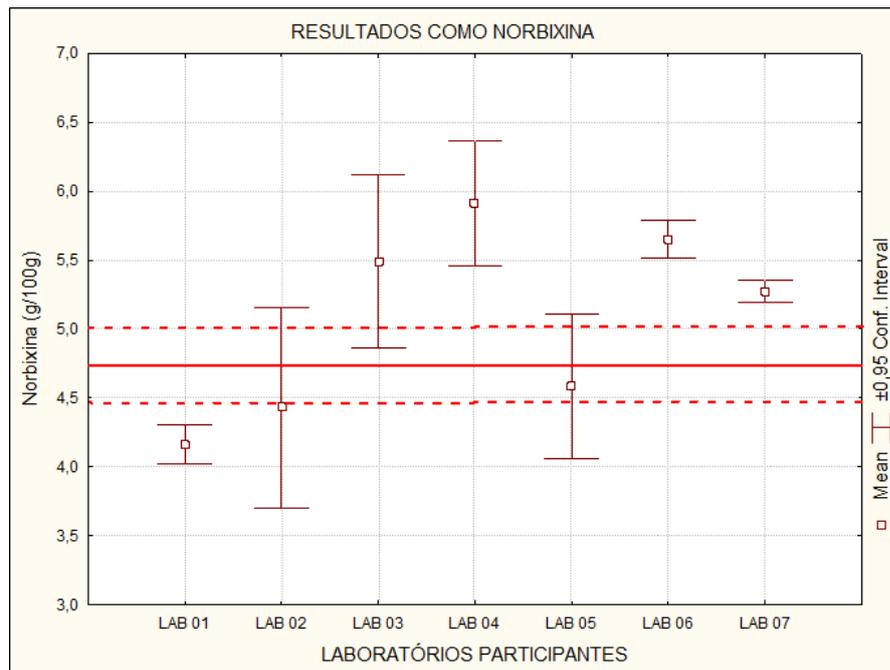


FIGURA 4. Média e o intervalo de confiança (95%) dos resultados das análises de carotenoides totais expressos como norbixina apresentados pelos laboratórios participantes do estudo. A linha sólida representa o valor que convencionamos como verdadeiro para as amostras do estudo (4,78 g/100g) e a linha tracejada dois desvios padrões obtidos pela equação de HORWITZ (0,30 g/100g).

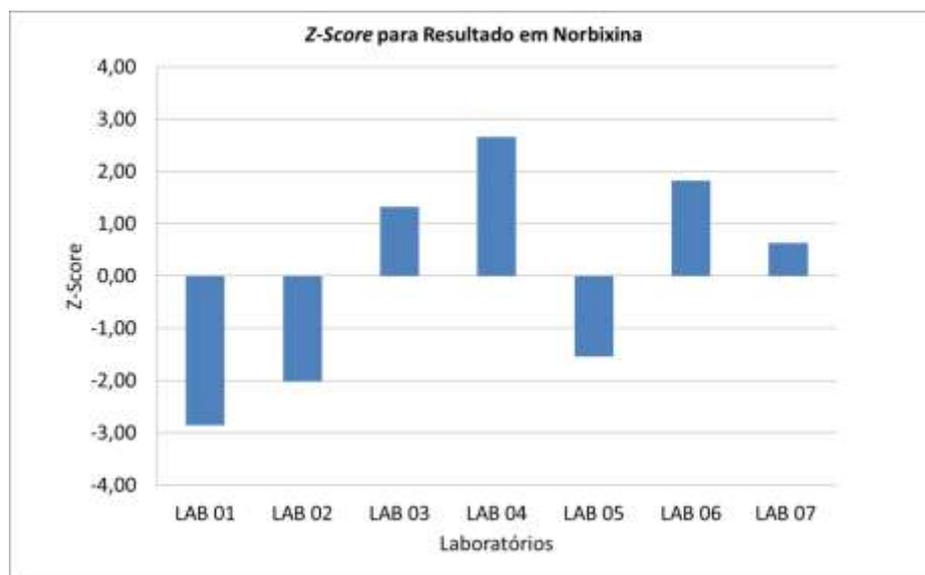


FIGURA 5. Z-Score das análises de carotenoides totais expressos como norbixina utilizando como referência a média dos resultados apresentados pelos laboratórios participantes (5,07 g/100g).

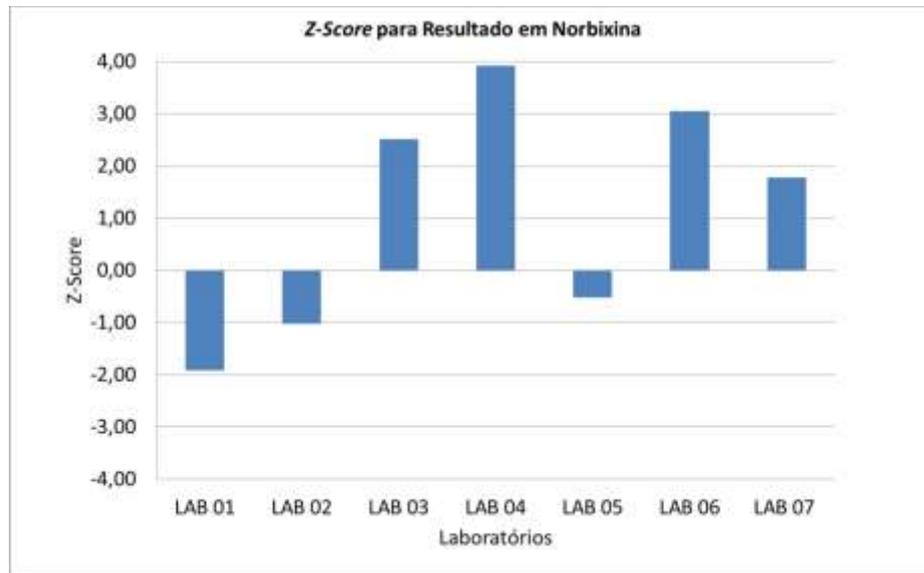


FIGURA 6. Z-Score das análises de carotenoides totais expressos como norbixina utilizando como referência o valor que convencionamos como verdadeiro (4,78 g/100g) para as amostras do estudo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por esse estudo indicam que:

- As amostras de corante e sementes de urucum utilizadas como referência atenderam as premissas estabelecidas para que fossem consideradas homogêneas.
- Sete laboratórios participantes do estudo encaminharam resultados das análises de carotenoides totais expressos como norbixina e/ou como bixina para as amostras de referência de sementes de urucum. Alguns laboratórios apresentaram os resultados das análises do corante, mas esses resultados não foram considerados nesse estudo pois o valor de referência da amostra de corante foi antecipadamente divulgado.
- Se convencionarmos como verdadeira a concentração de carotenoides totais expressos como norbixina igual a 4,78 g/100g, as médias aritméticas dos resultados analíticos apresentados pelos laboratórios variaram de 87% a 124% desse valor.
- Quando utilizamos como referência o valor convencionado como verdadeiro (4,78 g/100g), quatro laboratórios (LAB 1, LAB 2, LAB 5 e LAB 7) apresentaram desempenhos satisfatórios ($|z| \leq 2$), um laboratório (LAB 3) apresentou resultado

- considerado questionável ($2 < |z| < 3$). Dois laboratórios (LAB 4 e LAB 6) apresentaram resultados considerados insatisfatórios.
- e) Quando utilizamos como referência a média do conjunto de valores fornecidos pelos laboratórios participantes do estudo (5,07 g/100g), quatro laboratórios (LAB 3, LAB 5, LAB 6 e LAB 7) apresentaram desempenhos satisfatórios ($|z| \leq 2$) e três laboratórios (LAB 1, LAB 2 e LAB 4) apresentaram resultados considerados questionáveis ($2 < |z| < 3$). Nenhum laboratório apresentou resultado considerado insatisfatório.
- f) Todas as metodologias analíticas utilizadas pelos laboratórios apresentaram resultados com incerteza (estimativa de desvio padrão) dentro (inferior) do estabelecido como aceitável para o estudo (0,30 g/100g).
- g) As metodologias analíticas utilizadas pelos participantes do estudo permitiram as seguintes conclusões:
- Apenas um laboratório não usou soluções alcalinas para a extração dos pigmentos (utilizou extração com acetona, com leitura a um comprimento de ondas de 480nm e um coeficiente de absorção igual a 2826).
 - Dos laboratórios que utilizaram soluções alcalinas no processo de extração e leitura espectrofotométrica dos pigmentos, apenas um utilizou comprimento de ondas de 482nm para a leitura espectrofotométrica e coeficiente de absorção igual a 2870.
 - A maioria dos laboratórios participantes utilizou a metodologia descrita nesse estudo para a validação das amostras de sementes de urucum (extração com soluções alcalinas, leitura espectrofotométrica a um comprimento de onda igual a 453 nm e um coeficiente de absorção igual a 2850).

8. OBSERVAÇÃO

Os resultados desse estudo não devem ser compreendidos como aprovação ou rejeição da metodologia analítica empregada por cada um dos laboratórios participantes. Esse estudo também não deve ser interpretado como um *ensaio de proficiência* ou como *certificação de amostra*, mas os resultados podem servir a esses laboratórios para a comparação do seu desempenho, nos ensaios de carotenoides totais expressos como bixina ou norbixina em sementes de urucum, frente aos demais laboratórios participantes desse estudo.

9. BIBLIOGRAFIA

BRENDOLAN, Curso de Estatística. SGB Consultoria Química Ltda. 2004, 98p.

BRENDOLAN, G. Curso: Quantificação de Incertezas em Medição Químicas. SGB Consultoria Química Ltda. 2006, 50p.

CARVALHO, P.R.N.; SILVA, M.G.; MOREIRA, C.G. Avaliação dos métodos espectrofotométricos de análise de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). Coletânea do ITAL, Campinas, v. 23, n. 2, p.181-188, 1993.

COSTA NETO, P. L. O. Estatística. 2ª Ed. Editora Edgard Blucher, São Paulo. 2002, 266p.

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

SILVA, M.G. Análises de pigmentos em sementes de urucum. In: Anais da I Reunião Nacional Da Cadeia Produtiva Do Urucum, Campinas. Campinas: ITAL, 2007. p. 79-83.