

Análise de pigmentos em sementes de urucum

Marta Gomes da Silva

martags@ital.sp.gov.br



ITAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



Análise de pigmentos em sementes de urucum

Técnicas de análise

- Cromatografia em camada delgada
- Cromatografia em coluna aberta
- CLAE
- Ressonância magnética nuclear
- Espectroscopia de massa



Método espectrofotométrico:

- Extração - solventes orgânicos como clorofórmio ou acetona ou hexano ou metanol, a frio ou a quente
- Alcalino – hidróxido de sódio ou potássio, com temperatura

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Alcalino - Sementes de urucum podem estar inteiras ou moídas

Carvalho et al., 1992

- fator para converter norbixina em bixina é 1,037
- fator para converter sal de norbixina em bixina é 1,016 – KOH e 1,076 – NaOH
- Coeficiente de absorção utilizado para o cálculo
 - $\lambda 453\text{nm}$, KOH ou NaOH, Coeficiente de absorção de 2850 ± 40
 - $\lambda 470\text{nm}$, CHCl_3 , Coeficiente de absorção de 3230 ± 80

Yabiku & Takahashi, 1992 – estudo colaborativo
Sementes trituradas – extração com clorofórmio
Sementes inteiras – extração alcalina

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Testes

Solvente	Massa (g)	Forma de extração	Volume (mL)	Bixina (g/100g)
CHCl ₃	2,0g	Extração exaustiva com agitação 30, 10mL	250	2,60±0,23
Acetona	2,0g	Extração exaustiva com agitação 30, 10mL	250	3,53±0,04
NaOH 5%	2,0g	NaOH – ebulição por 1 minuto	250	4,66±0,16
Solução sabão*	2,0g	Solução saponificação + KOH – ebulição por 1 minuto	250	5,43±0,08

* Solução de saponificação foi preparada com óleo de mamona, KOH 45% e água

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Método proposto e validado para análise em sementes inteiras

- Tomada amostra – 10g
- Volume solução saponificação trabalho – solução saponificação*: KOH45%:H₂O (0,4:1,1:8,5) (v/v) – 60mL
- Ebulição – 1 minuto
- Massa inicial ajustada para 250g
- Agitação por 10 minutos
- Diluição – 1:100-0,5:5mL com KOH 0,5%
- Leitura: λ 453nm, $E_{1cm}^{1\%}$ 2850, fator para converte sal de norbixina para bixina de 1,16

* Solução saponificação: óleo de mamona: KOH 45%:H₂O (5:1,7:3,3) (v/v)

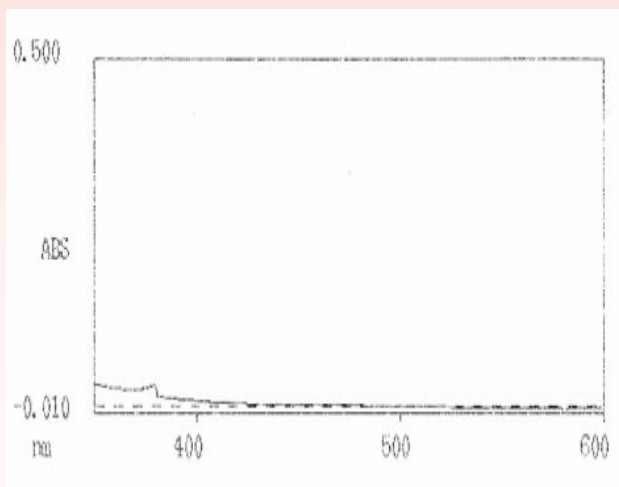
Análise de pigmentos em sementes de urucum



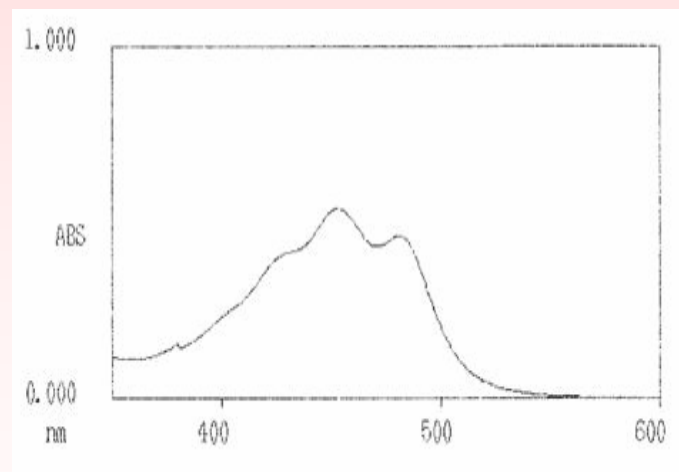
Validação – critérios

- Especificidade
- Linearidade
- Sensibilidade
- Precisão
- Robustez

Especificidade: varredura entre 350 e 600nm do branco dos reagentes



Solução de hidróxido de potássio 0,5%



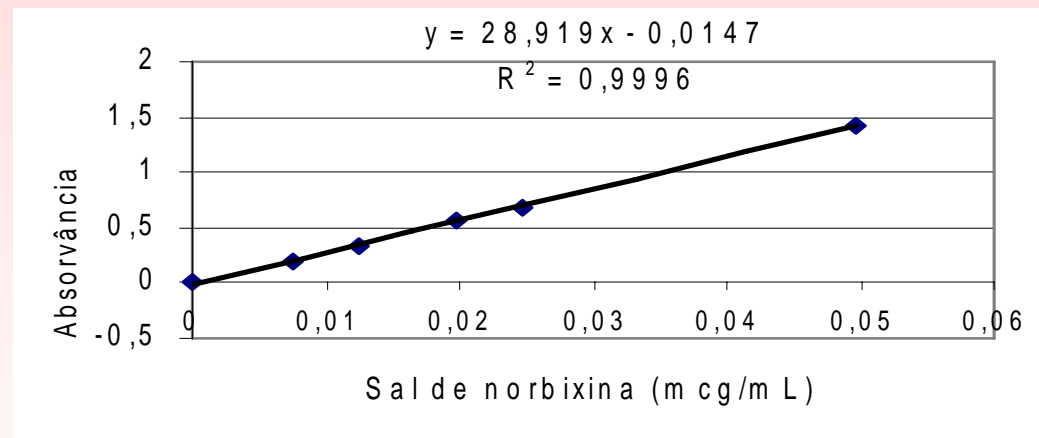
Varredura de uma amostra

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Linearidade: construção de uma curva com as seguintes concentrações: 0,0074; 0,0124; 0,0198; 0,0248 e 0,0496 $\mu\text{g/mL}$.

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



O t obtido foi 99,995 e o tabelado $t_{95,4}$ é 2,776.

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Sensibilidade: construção de uma curva com concentrações inferiores ao menor ponto da curva de analítica, com três leituras consecutivas de cada ponto.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{BL} + 3S_{BL}}{B} \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{BL} + 10S_{BL}}{B} \frac{1}{\sqrt{N}}$$

Curva analítica: $y = -0,0147 + 28,919x$

Curva concentração/absorbância: $y = -0,0063 + 28,619x$

Curva concentração/s: $y = -2E-17 + 7E-15x$

$$Y_{bl} = 0,0063 \quad S_{bl} = 2,00E-17 \quad B = 28,919$$

Limite de detecção: 0,31mg de sal de norbixina /100g de sementes de urucum

Limite de quantificação: 0,63mg de sal de norbixina /100g de sementes de urucum

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Precisão do sistema: 10 leituras consecutivas de uma amostra e o coeficiente de variação entre as leituras foi comparado com o valor encontrado no teste de repetitividade.

Precisão do método: 7 repetições analíticas em paralelo em uma amostra, e o valor de coeficiente de variação (CV%) encontrado foi avaliado pela equação de Horwitz (CV Max).

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

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Precisão do sistema	
Ensaio	Absorbância
1	0,482
2	0,482
3	0,482
4	0,481
5	0,482
6	0,481
7	0,481
8	0,481
9	0,481
10	0,481
Média	0,481
s	0,00049
CV (%)	0,10
CV Max (%)	4

Ensaio	Sal de norbixina (g/100g)	Bixina (g/100g)
1	4,68	5,43
2	4,69	5,44
3	4,89	5,67
4	4,74	5,50
5	4,64	5,39
6	4,60	5,34
7	4,70	5,45
Média	4,71	5,46
s	0,09	0,11
%CV	2	2
%CV Max	4	4

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Robustez

	Parâmetros	Nominal (-)	Variação (+)
A/a	λ	453nm	482nm
B/b	Peso amostra	10g	25g
C/c	Peso amostra	5g	10g
D/d	Volume/massa	Volume (mL)	Massa (g)
E/e	Tempo agitação	5 minutos	10 minutos
F/f	Tempo ebulição	1 minuto	2 minutos
G/g	Peso amostra	2,5g	10g

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Robustez

Cálculo: matriz segundo

Quattrocch, et al., 1992

| Resultado obtido| > s

$$\sqrt{2} \quad 0,16$$

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	7	8	Resultado
A/a	4,87	4,87	4,87	4,87	4,20	4,20	4,20	4,20	0,50
B/b	5,46	5,46	5,67	5,67	5,46	5,46	5,67	5,67	-0,21
C/c	5,46	5,22	5,46	5,22	5,46	5,22	5,46	5,22	0,24
D/d	5,46	5,46	5,14	5,14	5,14	5,14	5,46	5,46	0,32
E/e	5,46	5,75	5,46	5,75	5,75	5,46	5,21	5,46	-0,16
F/f	5,46	5,54	5,54	5,46	5,46	5,54	5,54	5,46	-0,08
G/g	5,46	5,16	5,16	5,46	5,16	5,46	5,46	5,16	0,30

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Robustez

Foi incorporado ao método analítico

- tomada de amostra 10g
- tempo de agitação de 10 minutos
- volume inicial de 250mL substituído por massa (g)
- leitura $\lambda 453\text{nm}$

Análise de pigmentos em sementes de urucum



Incerteza

Cálculo de incerteza expandida do resultado analítico:

- incertezas da massa
- incertezas da vidraria volumétrica
- incertezas dos pipetadores
- incerteza do espectrofotômetro
- incerteza do coeficiente de absorção
- precisão do método

Análise de pigmentos em sementes de urucum

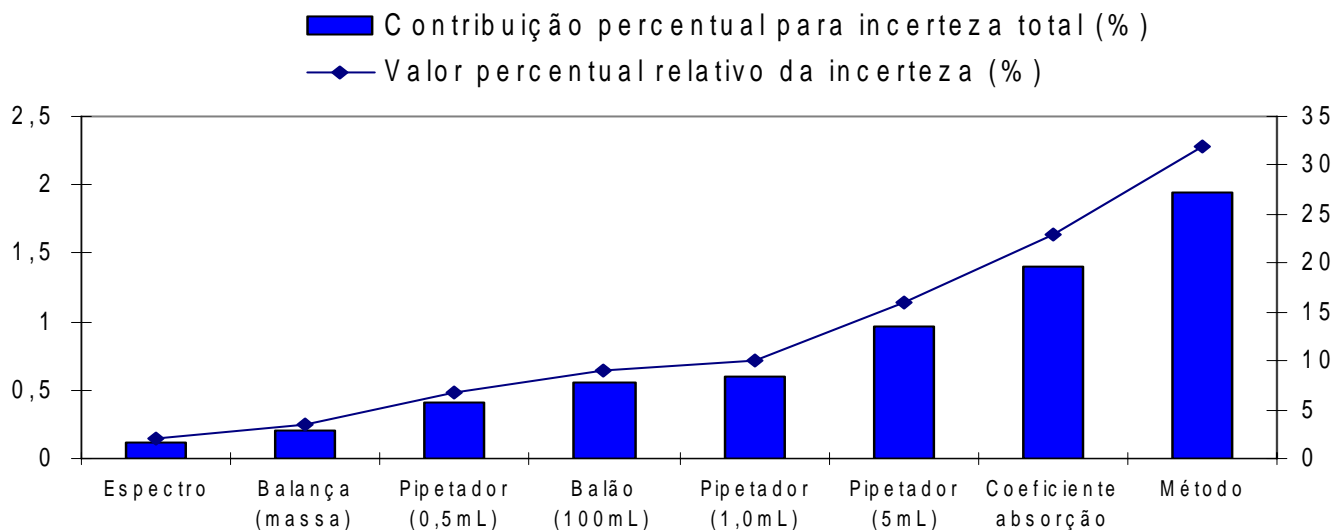


Incerteza

Nas condições da validação:

carotenóides totais expressos como bixina por 100g de sementes – $5,46\text{g} \pm 0,30\text{g}$ (K=2)

• Carotenóides totais expressos como sal de norbixina por 100g de sementes – $4,71\text{g} \pm 0,26\text{g}$ (K=2)



Análise de pigmentos em sementes de urucum



Agradecimentos

As empresas que participaram do estudo disponibilizando seus métodos analíticos para avaliação.

Obrigado