

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

**Programa Interlaboratorial de Controle de Qualidade – Padronização
de Métodos de Análise de Teor de Bixina em Sementes de Urucum**

Helena Yuco YABIKU

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Programa Interlaboratorial de Controle de Qualidade - Padronização de Métodos de Análise de Teor de Bixina em Sementes de Urucum

Helena Yuco YABIKU*

Os corantes naturais pertencem a uma das classes de aditivos permitidos pela legislação para alimentos. Estes aditivos estão sendo usados há bastante tempo, ainda que em pequena escala.

Atualmente há grande interesse em substituir os corantes artificiais pelos naturais. Destes corantes, o mais utilizado em alimentos que se encontram no mercado, é o urucum.

O urucueiro é uma planta de clima tropical que atinge de 2 a 6 metros de altura. É formada de folhas, flores e as cápsulas que envolvem as sementes. Estas sementes possuem conformação arredondadas, revestidas por uma polpa de coloração avermelhada que é o pigmento.

A partir das sementes de urucum são obtidos os extratos lipossolúveis e hidrossolúveis. O extrato lipossolúvel contém diversos componentes coloridos, sendo o principal a bixina e o extrato hidrossolúvel contém como componente colorido principalmente a norbixina, produto de hidrólise da bixina.

Devido ao solo bastante propício para o plantio de urucum, o Brasil, hoje, é um dos maiores produtores, e a sua comercialização no mercado externo vem crescendo dia-a-dia.

Comercialmente, o preço das sementes do urucum está vinculado ao teor de bixina contido nas mesmas.

Para os dois extratos, lipossolúvel e o hidrossolúvel, já existem metodologias para a determinação dos seus corantes, o que não acontece com as sementes.

A necessidade de se conhecer o teor de corantes nas sementes foi abordada durante o Seminário de corantes realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos em setembro/88 onde um grande número de interessados dentre os quais os produtores, comerciantes e pesquisadores se fizeram presentes.

Surgiu, então, a idéia de se formar um Grupo de Estudo para estabelecer uma metodologia única para determinação de bixina em sementes de urucum. Essa padronização é de extrema importância no controle do teor do corante na semente e conseqüente comercialização.

Esse Grupo de Estudo está sob a coordenação de Helena Yabiku e Mickiko Takahashi, da Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz. Os trabalhos tiveram início em 29/09/88 e continua até a presente data, isto é, 28/06/89.

Participam do Grupo as seguintes firmas e instituições:

Adicon Ind. e Com. de Aditivos Ltda. – Sara M. Menendez Ruiz
Baculê Agro Industrial Ltda. – Victor P. de Oliveira
Biocon do Brasil Indl. Ltda – Mônica S. de Lacerda
Cisatec Ltda. – Rosa Cisneros
Coca-Cola Ind. Ltda. – Hiroko N. Machado
Cooperativa Agrícola de Cotia – Luis Manfredini H. Requejo

*Instituto Adolfo Lutz

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Coveg Ind. Com., Imp. e Exp. Ltda. – Sergio R. Reggiani
 EMBRAPA/CTAA – Ismênia S.S. Guimarães
 Lucia de Paula N. Garcia
 EMBRAPA/CPATU – Raimunda F. de Nazaré
 Ha-La do Brasil – José E. Chiraldini
 Importadora Brastokio Ltda. – Takatoshi Uesaka
 Instituto Adolfo Lutz – Helena Y. Yabiku
 Mickiko Y. Takahashi
 Instituto Agrônomo de Campinas – Fernando R. Duarte
 Instituto de Pesquisas Tecnológicas – Cleide de B. Barros
 Instituto de Tecnologia de Alimentos – Paulo R.N. Carvalho
 Kienast & Kratschmer Ltda. – Karola Zimmer
 Kitano S/A Ind. Com. e Imp. – Dayse M. de Araújo
 Ministério da Agricultura – Secretaria Nacional de Abastecimento – Ivonete Raséra
 Nestlé Ind. Com. Ltda. – André F.A. de Oliveira
 José Nerval G. de Toledo
 Rio Preto Produtos Naturais Ltda. – Marcos L.J. de Meio
 Sanrisil Imp. Ext. S.A. – Hélio Cosentino
 Sociedade Brasileira de Urucum – Álvaro A. Mello
 Universidade de Campinas (UNICAMP) – Délia R. Amaya
 Helena T. Godoy
 Universidade de Ribeirão Preto – Ana Maria Soares
 Universidade de São Paulo – Ramón Guitián

As sementes utilizadas durante todo o estudo foram gentilmente fornecidas pela firma Baculerê Agro Indl. Ltda.

Na primeira reunião foi estabelecida que os participantes realizariam as análises com a própria metodologia utilizada nos seus laboratórios.

Os resultados encontrados foram os mais variáveis, uma vez que os métodos e procedimentos foram bastante diferentes tais como o modo de extração, a quente ou a frio, solventes utilizados, tomada da amostra, amostra triturada ou não, etc.

Os resultados obtidos estão na Tabela 1. Os laboratórios encontram-se codificados por letras do alfabeto.

Tabela 1.

Laboratório	Teor de Bixina (%)
A	1,92
B	2,70
C	2,61
D	2,10
E	2,18
F	2,14
G	2,72
H	2,39
I	1,21
J	1,47

Média \pm Desvio Padrão = 2,14 \pm 0,51

($\bar{X} \pm S$)

Coefficiente de variação = 23,82

(CV) (%)

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Em seguida, foi decidido que os participantes realizariam as análises utilizando a mesma metodologia e as mesmas amostras.

Método 1

Pesar 3g de amostra. Aquecer em refluxo durante 1 hora com 100ml de clorofórmio. Transferir para um balão volumétrico de 250ml, filtrando em lã de vidro. Repetir a extração com mais 2 porções de 50ml de clorofórmio, durante 30 minutos de cada vez. Completar o volume no balão volumétrico de 250ml. Fazer 1 diluição conveniente para leitura a 470nm, usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$

Método 2 (Ha-La do Brasil - no original)

Pesar 25g de amostra em um béquer de 600ml. Adicionar 150ml de solução de KOH a 5%. Pesar tudo em balança semi-analítica. Ferver com agitação, durante 1 minuto, cronometrado. Esfriar à temperatura ambiente. Pesar tudo novamente e completar com água até atingir o peso anterior. Adicionar 350ml de água. Decantar. Pipetar 1ml do líquido límpido em balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com solução de KOH a 0,5%. Fazer a leitura a 453nm, usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$ para cálculo.

Obs.: 1,037 é o fator de conversão da norbixina para bixina

Método 3

Pesar 25g de amostra em um béquer de 600ml. Adicionar 150ml de solução de KOH a 5%. Ferver com agitação durante 1 minuto, cronometrado. Esfriar à temperatura ambiente e completar com água no balão volumétrico de 1000ml. Pipetar 2ml do líquido em balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com solução de KOH a 0,5%. Branco = KOH a 0,5%

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$; $\lambda = 453\text{nm}$

Método 4

Pesar aproximadamente 1g de amostra em um erlenmeyer e extrair com clorofórmio a frio (shaker, agitação magnética, bastão de vidro, ultrassom). Transferir para um balão volumétrico de 100ml, filtrando em lã de vidro. Fazer uma diluição conveniente para leitura a 470nm, usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$.

Método 5 (UNICAMP)

Fazer o quarteamento da amostra (caso tenha mais que 50g) até obter 50g (não esqueça de misturar bem a amostra). Separar 10-20g e triturar no almofariz o máximo possível. Misture bem. Pesar 50mg em erlenmeyer de 50ml e extrair com aproximadamente 10ml de clorofórmio, agitando aproximadamente 2 minutos ou misturando com bagueta. Filtrar em kitasato a vácuo em funil de vidro sinterizado. Retirar o resíduo do funil, lavando este com pequenas porções de clorofórmio (2ml) e voltar ao erlenmeyer, adicionando novamente 10ml de clorofórmio, repetindo a operação até que o clorofórmio fique sem coloração. Completar o volume em balão volumétrico com clorofórmio, considerando a quantidade do mesmo na extração. Fazer a diluição necessária para se obter a leitura em um espectrofotômetro, fazendo a varredura de 350 a 550nm. A quantificação é feita aplicando a Lei de Beer e levando em consideração o pico de máxima absorção (470nm) e absorvidade de 2826.

Método 6

Pesar 25g da amostra e colocar em erlenmeyer de 500ml. Adicionar 150ml de KOH a 5%. Aquecer à ebulição e cronometrar 1 minuto. Esfriar em água corrente. Filtrar em lã de vidro, em balão volumétrico de 1000ml, extraindo com 7 porções de 100ml de KOH a 5%. Completar. Tomar 2ml da solução e colocar no balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com KOH a 0,5%. Ler a 435nm usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$ Branco = 0,5 de KOH

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos**Método 7**

Pesar 25g da amostra e colocar em erlenmeyer de 500ml. Extrair com KOH a 5% a frio, 7 vezes com porções de 100ml. Filtrar em lã de vidro e completar no balão volumétrico de 1000ml. Tomar 2ml da solução e colocar no balão volumétrico de 1000ml e completar o volume com KOH a 0,5%. Ler a 453nm, usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$.

Método 8

Pesar 5g de amostra e transferir para um erlenmeyer de 250ml. Extrair com 100ml de clorofórmio com agitação magnética por 30 minutos. Filtrar em lã de vidro para um balão volumétrico de 500ml e extrair com 7 porções de 50ml de clorofórmio. Completar o volume e fazer uma diluição conveniente para leitura a 470nm usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$.

Método 9 (ITAL)

Amostrar 100g de sementes e triturar em um moinho de facas. Pesar 2g da semente triturada e transferir para um erlenmeyer de 300ml. Adicionar 100ml de clorofórmio e agitar por 3 minutos. Filtrar em lã de vidro, recebendo o filtrado em um balão volumétrico de 250ml. Retornar o resíduo e a lã de vidro e reextrair com 50ml de clorofórmio. Filtrar em lã de vidro, recebendo o filtrado no balão volumétrico de 250ml. Repetir o procedimento de extração com mais 50 e 30ml de clorofórmio ou até a completa extração dos pigmentos. Completar o volume com clorofórmio. Retirar uma alíquota de 10ml e transferir para um balão volumétrico de 100ml. Completar o volume com clorofórmio. Retirar uma alíquota de 1ml e diluir com clorofórmio para 10ml em balão volumétrico. Traçar o espectro de absorvância, de 350 a 550nm, em espectrofotômetro, com cubetas de 1cm de percurso óptico. A concentração de bixina é calculada usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$ (470nm).

Método 10

Amostra: moída
Método: KOH à quente - 2g.

Método 11

Amostra: sementes inteiras
Método: KOH à quente - 25g

Método 12

Amostra: sementes que deverão ser moídas a critério de cada analista, em seu laboratório.
Método: de clorofórmio - 2g

Método 13

Amostra: sementes que deverão ser moídas a critério de cada analista, em seu laboratório.
Método: KOH à quente - 2g.

Método 14

Amostra: sementes inteiras.
Método: KOH à quente - 25g.

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Laboratório	Teor de Bixina (%)				
	1	2	3	4	5
A	2,47	2,72	2,37	1,96	5,86
B	-	-	2,30	2,90	3,10
C	2,03	2,59	-	-	2,50
D	2,34	2,52	2,29	2,13	-
E	2,14	2,49	2,43	1,74	2,02
F	1,80	2,01	2,39	2,20	3,62
G	2,19	2,28	2,13	2,55	2,64
H	2,55	2,46	2,64	2,48	4,33
I	1,83	2,05	2,17	1,69	-
J	2,80	3,30	2,40	2,60	3,30
K	2,62	2,05	2,39	2,59	4,95
L	2,46	2,54	2,28	2,70	3,63
Média ± Desvio Padrão ($\bar{X} \pm S$)	2,29 ± 0,32	2,46 ± 0,37	2,34 ± 0,14	2,32 ± 0,40	3,60 ± 1,18
Coefficiente de variação (CV) (%)	13,97	15,04	5,98	17,24	32,78

CV > 10 pequena dispersão
 20 < CV < 10 média dispersão
 CV > 20 grande dispersão

Laboratório	Teor de Bixina (%)			
	6	7	8	9
A	2,05	1,26	2,27	2,40
B	2,30	1,72	1,90	2,31
C	2,37	1,61	2,02	2,24
D	2,32	1,10	-	2,20
E	2,00	-	-	-
F	2,27	1,56	2,00	2,22
G	1,84	1,41	2,28	2,35
H	2,36	0,87	2,12	2,44
I	2,00	1,47	-	-
J	-	2,01	2,30	2,45
K	2,12	1,60	2,11	2,46
L	2,40	2,19	2,33	2,48
Média ± Desvio Padrão ($\bar{X} \pm S$)	2,18 ± 0,19	1,53 ± 0,38	2,14 ± 0,15	2,36 ± 0,11
Coefficiente de variação (CV) (%)	8,72	24,84	7,01	4,66

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Laboratório	Teor de Bixina (%)		Métodos			
	10	11	12	13	14	
A	1,92	1,92	1,79	1,54	2,32	
B	1,70	1,50	-	-	-	
C	1,70	1,55	2,60	2,33	2,10	
D	-	-	2,06	2,10	2,27	
E	-	-	-	-	-	
F	-	-	-	-	-	
G	-	-	-	-	-	
H	1,80	1,84	1,74	1,50	2,11	
I	-	-	-	-	-	
J	1,61	1,84	2,01	2,75	1,94	
K	1,72	1,74	2,57	2,15	2,19	
L	1,43	1,89	2,43	2,51	2,43	
M	1,69	1,80	2,87	2,90	2,17	
Média ± Desvio Padrão ($\bar{X} \pm S$)	1,70 ± 0,14	1,76 ± 0,16	2,26 ± 0,42	2,22 ± 0,51	2,19 ± 0,15	
Coefficiente de variação (CV) (%)	8,24	9,09	18,58	22,97	6,85	

Como analisar valores discrepantes: Critérios de Rejeição

 $\bar{X} \pm 2S$

Método	Valor Mínimo	Valor Máximo	$\bar{X} \pm 2S$
1	1,80	2,80	1,65 — 2,93
2	2,01	3,30	1,72 — 3,20
3	2,13	2,64	2,06 — 2,62
4	1,69	2,90	1,52 — 3,12
5	2,02	5,86	1,24 — 5,96
6	1,84	2,40	1,80 — 2,5
7	1,10	2,19	0,77 — 2,29
8	1,90	2,33	1,84 — 2,44
9	2,20	2,48	2,14 — 2,58
10	1,43	1,92	1,42 — 1,98
11	1,50	1,92	1,44 — 2,08
12	1,74	2,87	1,42 — 3,10
13	1,50	2,90	1,20 — 3,24
14	1,94	2,43	1,89 — 2,49

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Método de KOH (Resumo)

Método	Discriminação	$\bar{X} \pm S$	CV (%)
2	sementes inteiras 25g, (Ha-La no original)	2,46 ± 0,37	15,04
3	sementes inteiras 25g, (no balão volumétrico) várias lavagens	2,34 ± 0,14	5,98
6	sementes inteiras 25g, extração 7x	2,18 ± 0,19	8,72
7	sementes inteiras 25g, a frio, extração 7x	1,53 ± 0,38	24,84
10	sementes moídas 2g, extração 7x	1,70 ± 0,14	8,24
11	sementes inteiras 25g, extração 7x	1,76 ± 0,16	9,09
13	sementes moídas no próprio laboratório 2g, extração 7x	2,22 ± 0,51	22,97
14	sementes inteiras 25g, extração 7x	2,19 ± 0,15	6,85

Método de Clorofórmio (Resumo)

Método	Discriminação	$\bar{X} \pm S$	CV (%)
1	sementes inteiras 3g, refluxo, extração 2x	2,29 ± 0,32	13,97
4	sementes inteiras 1g, a frio	2,32 ± 0,40	17,24
5	sementes moídas 50mg, a frio, extração 3x	3,60 ± 1,18	32,78
8	sementes inteiras 5g, a frio, extração 7x	2,14 ± 0,15	7,01
9	sementes moídas 2g, a frio, extração 4x	2,36 ± 0,11	4,66
12	sementes moídas no próprio laboratório 2g, a frio, extração 4x	2,26 ± 0,42	18,58

Seminário: Corantes Naturais para Alimentos

Método provisório para determinação de Bixina em sementes de Urucum

Método de KOH

Pesar com precisão do mg, cerca de 25g de amostra para um erlenmeyer de 500ml. Adicionar 150ml de solução de KOH a 5%, fervente. Aquecer à ebulição mantendo-a por um minuto. Esfriar em água corrente. Filtrar através de lã de vidro para um balão volumétrico de 1000ml e lavar o resíduo com 100ml de água destilada. Repetir o processo de lavagem mais 7 vezes. Completar o volume com água destilada.

Tomar uma alíquota de 2ml desta solução e transferir para balão volumétrico de 1000ml, completando-o com solução de KOH a 0,5%. Ler em espectrofotômetro a 453nm, em célula de 1cm de percurso óptico, contra um branco de solução de KOH a 0,5%.

Cálculo: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ da norbixina = 3473

A % de norbixina encontrada multiplicada pelo fator 1,037 → % de bixina

Obs.: O método apresenta resultados inferiores em relação ao método de clorofórmio.

Método de clorofórmio

Amostrar 100g de sementes e moer em um moinho de facas ou equivalente.

Pesar com precisão do mg, cerca de 2g da semente moída e transferir para um erlenmeyer de 300ml. Adicionar 100ml de clorofórmio e agitar vigorosamente por 3 minutos. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado em um balão volumétrico de 250ml. Retornar o resíduo e a lã de vidro e reextrair com 50ml de clorofórmio. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado no mesmo balão volumétrico. Repetir o procedimento de extração com mais 50 e 30ml de clorofórmio ou até a completa extração dos pigmentos. Completar o volume com clorofórmio. Retirar uma alíquota de 10ml e transferir para um balão volumétrico de 100ml. Completar o volume com clorofórmio. Retirar uma alíquota de 10ml e diluir com clorofórmio em balão volumétrico de 100ml.

Traçar o espectro de absorvância, de 350 a 550nm, em um espectrofotômetro, com cubetas de 1cm de percurso óptico.

A concentração de bixina é calculada usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2826$ (470nm).

Obs.: Na moagem deve evitar ao máximo, o aquecimento da amostra, sob o risco de diminuição do teor de corante.

Algumas observações

1. O método de KOH apresenta resultados inferiores em relação ao método de clorofórmio.
2. Na moagem deve evitar ao máximo, o aquecimento da amostra, sob o risco de diminuição do teor de corante.
3. No método de KOH temos a extração de aproximadamente 98% de norbixina existente, sendo que o resíduo após extração com solvente, 7x, é de aproximadamente 1,3%.
4. O teor de norbixina decresce com o tempo em solução alcalina, sendo acentuada a decomposição na presença de luz.
5. Na observação dos espectros de absorção, não notamos alterações nos perfis dos mesmos, ocorrendo apenas a diminuição da absorvância.
6. A fim de verificar se a transformação de bixina em norbixina era total, foi feita uma análise utilizando o método de KOH, com uma bixina de pureza conhecida. Verificou-se que apenas 90% de bixina era transformada em norbixina.