

DETERMINAÇÃO DE BIXINA EM SEMENTES DE URUCUM: ESTUDO COLABORATIVO*

Helena Yuco YABIKU **
Mickiko Yamazaki TAKAHASHI **

RIALA 6/725

YABIKU, H. Y. & TAKAHASHI, M. Y. - Determinação de bixina em sementes de urucum: estudo colaborativo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 31-36, 1992.

RESUMO: Com a finalidade de estabelecer uma metodologia para a determinação de bixina em sementes de urucum, foi formado um Grupo de Estudo para a padronização de um método. Dois tipos de análise foram selecionados: uma utilizando o clorofórmio e sementes moídas que dosa bixina e outra utilizando o solução de hidróxido de potássio e sementes inteiras que dosa a norbixina. O melhor método foi o que utilizou o clorofórmio. Para equiparar o teor de norbixina encontrado pela extração com hidróxido de potássio ao teor de bixina obtido pelo outro tipo de análise utilizado, foi usado o fator de correção de 1,1601.

DESCRITORES: Sementes de urucum. Urucum. Bixina. Norbixina, determinação. *Bixa orellana* L.

INTRODUÇÃO

Os corantes naturais pertencem a um das classes de aditivos para alimentos permitidos pela legislação brasileira¹.

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

O urucueiro é uma planta de clima tropical que atinge de dois a seis metros de altura. É formada de folhas, flores e as cápsulas que envolvem as sementes. Estas sementes possuem conformações arredondadas revestidas por uma polpa de coloração avermelhada que contém o pigmento².

A partir da remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum (*Bixa orellana* L.) por vários processos são obtidos os extratos lipossolúveis e hidrossolúveis⁴.

O extrato lipossolúvel contém diversos componentes coloridos, sendo o principal a bixina e o extrato hidrossolúvel contém como principal componente colorido, a norbixina, produto de hidrólise da bixina.

Para os dois extratos já existem metodologias para determinação dos seus corantes⁴, o que não acontece com as sementes.

A necessidade de se conhecer o teor de corantes em sementes foi abordada durante o Seminário de Corantes Naturais realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos, em setembro de 1988³, onde um grande número de interessados, entre os quais produtores, comerciantes e pesquisadores se fez presente.

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 foi estabelecida após um estudo colaborativo conduzido neste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

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

Treze laboratórios participaram do estudo colaborativo e os mesmos encontram-se codificados por letras do alfabeto.

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O Grupo de Estudo de Urucum estabeleceu dois tipos de determinação. Estes foram conduzidos após inúmeros procedimentos, nos quais foram verificadas as melhores condições tais como tomada de amostra, trituração, modo de extração e solventes utilizados.

Métodos

1. Determinação de bixina

- Aparelhagem
- Moinho de facas ou equivalente
- Espectrofotômetro

Reagentes

Clorofórmio p.a.

Procedimento:

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

Pesar com precisão de mg, cerca de 2 g da semente moída e transferir para um erlenmeyer de 300 ml. Adicionar 100 ml de clorofórmio e agitar vigorosamente durante três minutos. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado em balão volumétrico de 250 ml. Retornar o resíduo e a lã e reextrair com 50 ml de clorofórmio. Filtrar através de lã de vidro, recebendo o filtrado no mesmo balão volumétrico. Repetir o procedimento de extração com alíquota de 50 e 30 ml de clorofórmio ou até a completa extração dos pigmentos. Completar o volume com clorofórmio. Repetir uma alíquota de 10 ml e transferir para um balão volumétrico de 100 ml. Completar o volume com clorofórmio. Pipetar uma alíquota de 10 ml e diluir com clorofórmio de 10 ml e diluir com clorofórmio em balão volumétrico de 100 ml. Fazer a leitura a 470 nm, usando clorofórmio como branco.

A concentração de bixina é encontrada usando:
 $E_{1cm}^{1\%} = 2826$.

2. Determinação de norbixina

Aparelhagem

Espectrofotômetro

Reagentes

Hidróxido de potássio a 5% e a 0,5%

Procedimento

Pesar com precisão de mg, cerca de 25 g de sementes em um erlenmeyer de 500 ml. Adicionar 150 ml de solução de KOH a 5%, fervente. Aquecer a ebulição mantendo-a por um minuto. Esfriar em água corrente. Filtrar através de lã de vidro para um balão volumétrico de 1000 ml e lavar o resíduo com 100 ml de água destilada. Repetir o processo de lavagem mais sete vezes. Completar o volume com água destilada. Retirar uma alíquota de 2 ml desta solução e transferir para um balão volumétrico de 1000 ml, completando-o com solução de KOH a 0,5%. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 423 nm, em cela de 1 cm de percurso óptico, usando como branco a solução de KOH a 0,5%.

A concentração de norbixina é encontrada usando
 $E_{1cm}^{1\%} = 3473$.

A % de norbixina encontrada multiplicada pelo fator 1,037 dá a % de bixina.

Análise estatística

Os cálculos estatísticos utilizados para verificar a variação entre os dois métodos estudados foram a média (\bar{x}), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

O fator de correção final de um método para outro foi estabelecido calculando-se a nova média após a eliminação dos valores fora do intervalo ($\bar{x} \pm S$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de análises realizadas pelos laboratórios participantes, em sementes de urucum pelos dois procedimentos em questão são mostrados na tabela 1.

TABELA 1
 Resultados de bixina, em sementes de urucum obtidos no estudo colaborativo*

| LABORATÓRIO | Bixina (%) | |
|---|--------------------------|-----------------------------|
| | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH |
| A | 2,40 | 2,32 |
| B | 2,31 | - |
| C | 2,24 | 2,10 |
| D | 2,20 | 2,27 |
| E | - | - |
| F | 2,22 | - |
| G | 2,35 | - |
| H | 2,44 | 2,11 |
| I | - | - |
| J | 2,45 | 1,94 |
| K | 2,46 | 2,19 |
| L | 2,48 | 2,43 |
| M | - | 2,17 |
| Média \pm Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | 2,36 \pm 0,11 | 2,19 \pm 0,15 |
| Coefficiente de variação (CV) (%) | 4,66 | 6,85 |

(*) Valores que representam média da análise em duplicata

(-) Dado não recebido

Quando se determina o teor do corante de urucum pelo método do clorofórmio, o que estamos dosando é a bixina, enquanto que no caso do método de KOH, é a norbixina que é o produto de hidrólise da bixina.

Portanto, o teor de norbixina encontrado deve ser multiplicado pelo fator 1,037 para expressar o teor de bixina na amostra.

Foi observado que a determinação utilizando solução de KOH apresentou resultados inferiores em relação ao do clorofórmio. Também foi observado que a variação entre os dois procedimentos era constante, sendo, portanto, possível expressar o teor de bixina, independente do procedimento utilizado, pela introdução de um fator de correção.

Esse fator de correção foi estabelecido também através de análises realizadas pelos laboratórios participantes, em cinco ensaios, utilizando-se os dois procedimentos anteriormente citados.

As tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os valores encontrados pelos dois procedimentos e o fator de correção obtido.

Na tabela 7 observam-se os fatores de correção obtidos nos cinco ensaios, e o fator de correção final foi de 1,1601.

Dessa maneira multiplicando o teor de norbixina encontrado por 1,1601, este pode ser equiparado ao teor de bixina obtido pela extração com clorofórmio.

TABELA 2
 Resultados de bixina obtidos no primeiro ensaio do estudo colaborativo*

| LABORATÓRIO | Bixina (%) | | Fator de correção Norbixina/Bixina |
|---|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH | |
| A | 1,943 | 1,657 | 1,1726 |
| B | 1,810 (1) | 1,680 (1) | 1,0774 |
| C | 2,000 (1) | 1,690 (1) | 1,1834 |
| D | 1,843 | 1,653 | 1,1149 |
| E | 1,913 | 1,703 | 1,1233 |
| F | 1,840 (2) | 1,650 (2) | 1,1152 |
| G | 1,830 | 1,435 | 1,2753 |
| H | 1,780 (2) | 1,540 (2) | 1,1558 |
| I | 2,060 (1) | 1,730 (1) | 1,1734 |
| Média ± Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | | | 1,1484 ± 0,0299 |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | | | 2,60 |

* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

TABELA 3
 Resultados de bixina obtidos no segundo ensaio do estudo colaborativo*

| LABORATÓRIO | Bixina (%) | | Fator de correção Norbixina/Bixina |
|---|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH | |
| A | 2,153 | 1,827 | 1,1784 |
| B | 1,896 | 1,503 | 1,1184 |
| C | - | - | - |
| D | - | - | - |
| E | 1,946 (1) | 1,740 (1) | 1,1184 |
| F | 2,030 (2) | 1,730 (2) | 1,1734 |
| G | - | - | - |
| H | - | - | - |
| I | - | - | - |
| J | 1,930 | 1,657 | 1,1648 |
| Média ± Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | | | 1,1722 ± 0,0688 |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | | | 0,59 |

*Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 4
 Resultados de bixina obtidos no terceiro ensaio do estudo colaborativo*

| LABORATÓRIO | Bixina (%) | | Fator de correção Norbixina/Bixina |
|---|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH | |
| A | 2,603 | 2,240 | 1,1620 |
| B | 2,300 | 1,793 | 1,2827 |
| C | - | - | - |
| D | - | - | - |
| E | 2,604 (1) | 2,099 (1) | 1,2405 |
| F | 2,350 (2) | 2,140 (2) | 1,0980 |
| G | - | - | - |
| H | - | - | - |
| I | - | - | - |
| J | 2,270 | 1,990 | 1,1407 |
| Média ± Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | | | 1,1797 ± 0,0504 |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | | | 4,26 |

* Valores que representam média de três determinações,

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 5
 Resultados de bixina obtidos no quarto ensaio do estudo colaborativo*

| LABORATÓRIO | Bixina (%) | | Fator de correção Norbixina/Bixina |
|---|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH | |
| A | 1,970 | 1,845 | 1,0677 |
| B | 1,923 | 1,577 | 1,2194 |
| C | - | - | - |
| D | 1,477 | 1,630 | 0,9061 |
| E | 2,024 (1) | 1,701 (1) | 1,1899 |
| F | 1,870 (2) | 1,711 (2) | 1,0929 |
| G | - | - | - |
| H | - | - | - |
| I | - | - | - |
| J | 1,830 | 1,577 | 1,1604 |
| Média ± Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | | | 1,1461 ± 0,0642 |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | | | 5,60 |

* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 6
 Resultados de bixina obtidos no quinto ensaio do estudo colaborativo*
 Bixina (%)

| LABORATÓRIO | Extração com clorofórmio | Extração com solução de KOH | Fator de correção Norbixina/Bixina |
|---|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| A | 2,419 | 2,213 | 1,0931 |
| B | 2,250 (2) | 1,890 (2) | 1,1905 |
| C | - | - | - |
| D | 2,080 | 1,930 | 1,0777 |
| E | 2,415 (1) | 2,075 (1) | 1,1639 |
| F | 2,370 (2) | 2,084 (2) | 1,1372 |
| G | - | - | - |
| H | - | - | - |
| I | - | - | - |
| J | 2,190 (1) | 1,886 (1) | 1,1612 |
| Média ± Desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | | | 1,1541 ± 0,0147 |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | | | 1,27 |

* Valores que representam média de três determinações.

(1) Resultado de duas determinações.

(2) Resultado de uma determinação.

(-) Dado não recebido

TABELA 7
 Fatores de correção obtidos nos cinco ensaios

| Tomada | Fator de correção |
|---|-------------------|
| 1 | 1,1484 |
| 2 | 1,1797 |
| 3 | 1,1722 |
| 4 | 1,1461 |
| 5 | 1,1541 |
| Média ± desvio padrão ($\bar{X} \pm S$) | |
| 1,1601 ± 0,0150 | |
| Coeficiente de variação (CV) (%) | |
| 1,29 | |

CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado, concluiu-se que:

1. A melhor metodologia para a determinação de bixina em sementes de urucum utiliza clorofórmio para extração e leitura espectrofotométrica a 470 nm.

2. O fator de correção para equiparar o teor de norbixina encontrado por extração com KOH, ao teor de bixina obtido pela extração com clorofórmio é de 1,1601.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos seguintes colaboradores de empresas e instituições que participaram do Grupo de Estudo de Urucum que se reuniram mensalmente de 20/09/88 a 08/03/90.

Adicon Ind. Com. de Aditivos Ltda.

Sara M. Menendez Ruiz

Baculerê Agroindustrial Ltda.

Victor P. de Oliveira

Biocon do Brasi Indl. Ltda.

Mônica S. de Lacerda

Cisatec Representações Ltda.

Rosa Cisneros

Walter Lorena

Coca Cola Ind. Ltda.

Hiroko N. Machado

Cooperativa Agrícola de Cotia.

Luiz M. Requeijo

Coveg Ind. Com. Imp. Exp. Ltda.

Sérgio R. Reggiani

Ha-La do Brasil

José Eduardo Ghiraldini

Importadora Brastóquio Ltda.

Takatoshi Uesaka

Instituto Adolfo Lutz

Helena Y. Yabiku

Michiko Y. Takahashi

Instituto Agrônômico de Campinas

Fenando R. Duarte

Instituto de Pesquisas Tecnológicas
Cleide B. Barros

Instituto de Tecnologia de Alimentos
Paulo R. N. Carvalho

Kienast & Kratschmer Ltda.
Karola Zimmer

Kitano S/A Ind. Com. Ltda.
Dayse M. de Araújo

Secretaria Nacional de Abastecimento
Ivonete T. Rasêra

Nestlé Ind. Com. Ltda.
André F. A. Oliveira
José Nerval G. de Toledo

Rio Preto Produtos Naturais Ltda.
Marcos L. J. de Melo

Sanrisil Imp. Exp. S/A
Hélio Cosentino

Sociedade Brasileira de Urucum
Álvaro A. de Mello

Universidade de Campinas
Délia R. Amaya
Helena T. Godoy

Universidade de Ribeirão Preto
Ana Maria Soares

Universidade de São Paulo
Ramón Guitián

RIALA6/725

YABIKU, H. Y. & TAKAHASHI, M. Y. - Determination of bixin in annatto seeds: Collaborative Study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 31-36, 1992.

ABSTRACT: In order to establish the methodology for determination of bixin in annatto seeds, a Group of Study was formed. Two kind of analysis were selected: one using chloroform, which gives bixin, and other using KOH, which gives norbixin. The best method were chloroform to extract the pigment. In order to compare the level of the bixin found by extraction with KOH to the level obtained by the other method, it is necessary to use correction factor of 1,1601.

DESCRIPTORS: Annatto seeds. Bixin, norbixin, determination. *Bixa orellana* L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, leis, decretos, etc. - *Resolução normativa n^o 04 do Conselho Nacional da Saúde*. Diário Oficial, Brasília, 19 dez. 1988. Seção I, p. 24718.
2. MELLO, A. A. & LIMA, L. C. F. - *Urucu: situação atual e perspectivas*. Região Norte e Nordeste. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, Campinas, 1989. *Resumos*, Campinas, ITAL, 1989, p. 59 - 66.
3. SEMINÁRIO DE CORANTES PARA ALIMENTOS, Campinas, 1988. *Resumos*. [Coord. Eidiomar Angelucci], Campinas, ITAL, 1988.
4. TAKAHASHI, M. Y. - *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade*. 2.^aed. São Paulo, 1987.

Recebido para publicação em 18 de outubro de 1991.