

# UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS NO INFRAVERMELHO (FTIR-UATR), ACOPLADAS A ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS, NA ANÁLISE DE QUALIDADE DE COLORÍFICOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO URUCUM

## USE OF INFRARED SPECTROSCOPIC TECHNIQUES (FTIR-UATR), COUPLED WITH MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSES, IN THE QUALITY ANALYSIS OF FOOD COLORINGS CONTAINING URUCUM

Devanir de Sousa Corrêa<sup>1</sup>  
Lucas Ferreira Lyra<sup>2</sup>  
Fatima Maria Broca<sup>3</sup>  
Ana Maria Barbosa<sup>4</sup>  
Kumiko Koibuchi Sakane<sup>5</sup>

**Resumo:** Os corantes alimentícios (CAs) possuem a importante função de melhorar a aparência e o sabor dos alimentos. Existem dois tipos de CAs, os artificiais, que são obtidos por síntese química e os naturais, que são extraídos de fontes naturais. Porém, o aumento da publicidade dos efeitos nocivos causados pelo uso de CAs sintéticos, assim como, das restrições de uso de vários tipos de CAs sintéticos, tem ajudado a aumentar o interesse na sua substituição por CAs naturais. O urucum, um corante natural extraído de sementes da *Bixa orellana*, tem o Brasil, como um dos seus maiores produtores e exportadores. O objetivo deste trabalho é analisar a qualidade de coloríficos, que contenham o urucum, utilizando as técnicas de FTIR-UATR, juntamente às análises estatísticas multivariadas. A identificação da banda analítica do urucum, localizada  $1716\text{ cm}^{-1}$ , permitiu a identificação do urucum dentro dos espectros infravermelhos dos coloríficos comerciais, sem necessitar de sua extração dos coloríficos analisados. Uma das amostras dos coloríficos obtidos, teve seus espectros retirados antes e depois de seu prazo de validade (uma vez por mês, por três meses, após seu prazo de validade). Utilizando as análises multivariadas, nos espectros dessa amostra, foi possível observar que houve uma alteração significativa em seu espectro ao longo do tempo, indicando que, essa alteração, possa ter sido, principalmente, causada pelo seu contato com o ar atmosférico e sua umidade e com a luminosidade do local onde foi armazenada.

**Palavras-chave:** urucum; coloríficos alimentícios; análise de qualidade; FTIR-UATR; análise estatística multivariada.

**Abstract:** Food colorings (FCs) have the important function of improving the appearance and flavor of foods. There are two types of FCs: the artificial ones, which are obtained by chemical synthesis, and the natural ones, which are extracted from

---

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia Química na Universidade do Vale do Paraíba, Univap. E-mail: devanirscorrea@hotmail.com.

<sup>2</sup> Mestrando em Engenharia Biomédica na Universidade do Vale do Paraíba, Univap. E-mail: lucasferreiralyra@gmail.com.

<sup>3</sup> Docente na Universidade do Vale do Paraíba, Univap. E-mail: fbroca@univap.br.

<sup>4</sup> Docente pesquisadora na Universidade do Vale do Paraíba, Univap. E-mail: ana.barbosa@univap.br.

<sup>5</sup> Docente pesquisadora na Universidade do Vale do Paraíba, Univap. E-mail: kumiko.sakane@gmail.com.

natural sources. However, the increased publicity about the harmful effects caused by the use of synthetic FCs, as well as the restrictions on the use of various types of synthetic FCs, have helped to increase the interest in their replacement with natural FCs. Urucum, a natural FC extracted from *Bixa orellana* seeds, has Brazil as one of its largest producers and exporters. The aim of this study is to analyze the quality of FCs which contain urucum, using FTIR-UATR techniques, together with multivariate statistical analyses. The identification of the analytical band of urucum, located at 1716  $\text{cm}^{-1}$ , allowed the identification of urucum within the infrared spectra of commercial FCs, without requiring its extraction from the analyzed FCs. One of the FC samples obtained had its spectra taken before and after its expiration date (once a month, for three months after its expiration date). Using the multivariate analyses in the spectra of this sample, it was possible to observe that there was a significant change in its spectrum over time, indicating that this change may have been caused mainly by its contact with atmospheric air and its humidity, as well as with the light of the place where it was stored.

**Key words:** urucum; food colorings; quality analysis; FTIR-UATR; multivariate statistical analysis.

**Data de submissão:** 23.11.2023

**Data de aprovação:** 03.04.2024

**Identificação e disponibilidade:**

(<https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/4532>,  
<http://dx.doi.org/10.18066/revistaunivap.v30i66.4532>).

## 1 INTRODUÇÃO

Os corantes alimentícios (CAs) têm desempenhado um papel importante ao longo da história, visando melhorar a aparência e o sabor dos alimentos (Chamone et al., 2020; Santos et al., 2022). A cor de um produto é, frequentemente, avaliada e associada ao sabor pelos consumidores, portanto, constitui um fator importante para produtos comerciais comestíveis (Demczuk Jr & Ribani, 2015). Existem dois tipos de CAs, os artificiais que são obtidos por síntese química e os naturais que são extraídos de matrizes naturais (de Toledo et al., 2021; Santos et al., 2022). O desenvolvimento de métodos de padronização e, conseqüentemente, a facilidade da padronização dos CAs sintéticos, em conjunto à sua grande disponibilidade, possibilitaram o aumento de sua aplicação e de seu consumo. No entanto, muitos dos CAs sintéticos utilizados no passado são tóxicos e representam um potencial de risco para a saúde humana (José et al., 2019).

A crescente divulgação dos efeitos nocivos dos CAs sintéticos e de restrições do uso de vários tipos de CAs sintéticos tem contribuído para a geração de interesse na substituição de CAs artificiais por CAs naturais, que são considerados uma alternativa mais saudável do que os sintéticos e apresentam efeitos benéficos à saúde, principalmente, pelo seu poder antioxidante e seus efeitos anti-inflamatórios (Chisté et al., 2011; Constant et al., 2021; de Toledo et al., 2021; Santos et al., 2022; Baptistão et al., 2023; Costa et al., 2023).

Entre os diversos tipos de CAs naturais, pode-se encontrar o urucum, que tem como origem as sementes da planta *Bixa orellana* encontrada em regiões tropicais da América Central e do Sul (Fontinele et al., 2018; Araujo et al., 2019; Silva et al., 2020; de Toledo et al., 2021). Da camada que envolve essas sementes, extrai-se o corante

ou pigmento, que se destaca pela sua coloração amarelo alaranjada e que contém os carotenoides bixina e norbixina, sendo que, a bixina, é o principal pigmento causador da coloração do urucum, pois representa aproximadamente 80 % dos carotenoides presentes nele (Olegário & dos Santos, 2014; Furini et al., 2021; de Toledo et al., 2021). A molécula da bixina possui dois grupos carboxílicos, sendo um deles com um éter metílico (Demczuk Jr & Ribani, 2015). A ação oxidante da bixina é sugerida por causa da presença de nove duplas ligações conjugadas alternadas na sua estrutura, que atuam como capturadores de radicais livres (Santos et al., 2022). Uma vez isolada da semente, a bixina torna-se muito vulnerável à degradação, podendo sofrer decomposição pela ação de calor, luz e oxidação (da Silva et al., 2020; Constant et al., 2021). Conseqüentemente, os compostos do urucum, também sofrem uma grande interferência das condições de processo e a sua decomposição ainda pode ser potencializada por determinados solventes (Lucarini et al., 2017; da Silva et al., 2020).

O urucum é uma das principais fontes de CAs naturais utilizados mundialmente e tem gerado um aumento de interesse em vários setores, como por exemplo, nas indústrias de alimentos, nas quais é aplicado como CA em derivados lácteos, embutidos, doces, licores, sorvetes e margarinas e em outros ramos industriais, que também fazem uso de suas propriedades tintoriais, como a indústria têxtil, a de cosméticos e a de tintas e vernizes (Olegário & dos Santos, 2014; de Sousa & de Faria, 2014; Demczuk Jr & Ribani, 2015; Balan, 2017; Chamone et al., 2020; Gonçalves et al., 2020; de Toledo et al., 2021; Santos et al., 2022). O urucum também possui propriedades versáteis e benéficas para a saúde, como a capacidade de reduzir inflamações, inibir o crescimento de fungos e bactérias, além disso, também é rico em antioxidantes que combatem os radicais livres, que são associados a doenças cerebrais, cardíacas e cancerígenas (Stuetz et al., 2017; Carvalho et al., 2022).

O mercado de CAs naturais cresce a cada ano, em razão da crescente procura por produtos saudáveis e, como seu movimento financeiro é estimado em US\$ 2,9 bilhões, os investimentos em pesquisas para aprimorar a qualidade e a estabilidade de produtos naturais, estão ganhando força, o que confere grande importância a estudos sobre CAs naturais como o urucum (Lucarini et al., 2017; Constant et al., 2021; Santos et al., 2022; Baptistão et al., 2023).

Impulsionado pela crescente demanda mundial e doméstica por produtos saudáveis e naturais, o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de CAs e sementes de urucum (Chisté et al., 2011; Baptistão et al., 2023). De acordo com o IBGE, em 2019, a produção brasileira de sementes de urucum, foi de 15.625 toneladas.

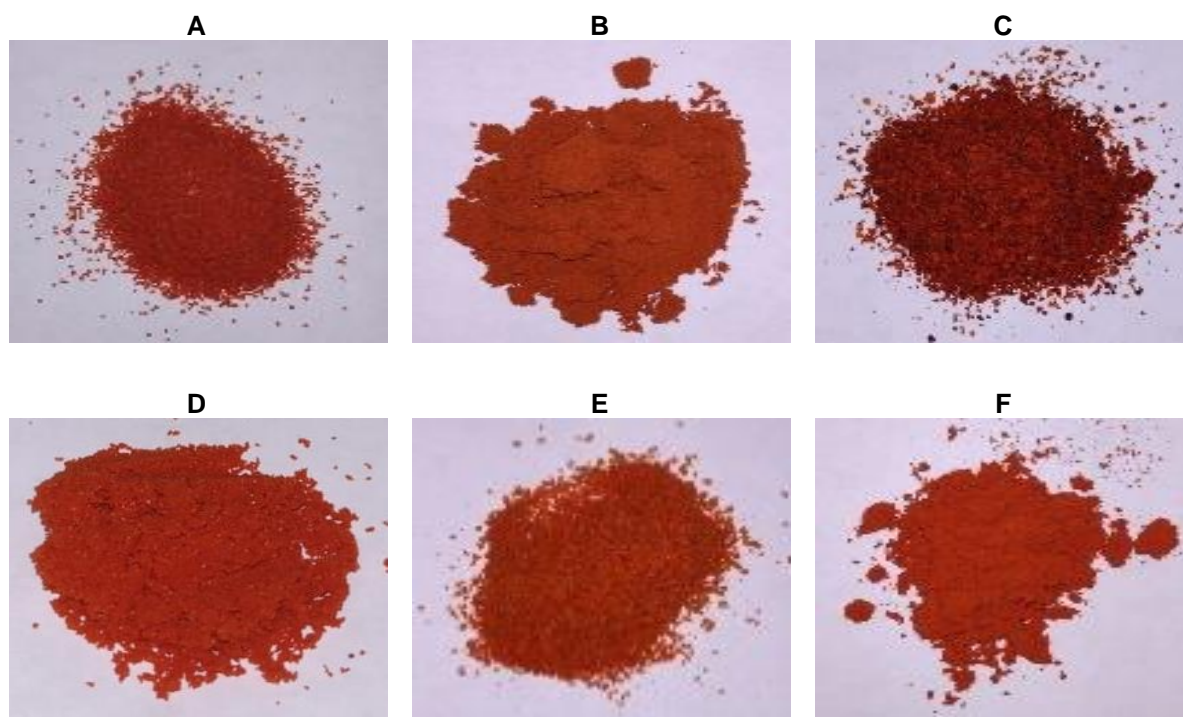
A espectroscopia no infravermelho estuda movimentos vibracionais de moléculas pela absorção da radiação infravermelha, sendo que, a região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  de um espectro de absorção no infravermelho, contém diversas informações sobre as estruturas e conformações dos constituintes moleculares de uma amostra (Barbosa, 2007; Smith, 2011). A aplicação de técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-UATR), a análises estatísticas multivariadas, é um método de análise rápido, não destrutivo, de baixo custo e frequentemente utilizado em análises de qualidade de alimentos (Lucarini et al., 2017; Ferreira et al., 2021; Ordoudi et al., 2023). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo, estudar a aplicação de técnicas de FTIR-UATR, acopladas às análises estatísticas multivariadas, para obter e analisar espectros infravermelhos do urucum e de CAs comerciais que o contenham.

## 2 METODOLOGIA

A amostra urucum foi obtida por meio de sementes da planta *Bixa orellana*, que foram adquiridas em mercados especializados na cidade de São Paulo (SP, Brasil). Dos seis CAs, todos contendo urucum e de origem brasileira que foram obtidos, quatro foram adquiridos por meio de supermercados e dois foram por meio da feira livre, sendo ambos localizados na cidade de São José dos Campos (SP, Brasil). Além dos seis CAs adquiridos, também foram obtidas amostras de fubá e de óleo soja, pois ambos são frequentemente utilizados na produção de CAs contendo urucum (Santos et al., 2022).

As amostras dos seis CAs comerciais adquiridos, a partir deste ponto, foram divididos nos grupos: A; B; C; D; E; F; onde cada letra representa uma amostra de um CA diferente, sendo que, as amostras A, C, D e E, pertencem aos quatro CAs obtidos em supermercados e as amostras B e F, pertencem aos CAs obtidos na feira livre. Fotos de todas as amostras (A – F), estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios comerciais, contendo urucum.



Fonte: autores.

Na Figura 1, observa-se que a diferença nas colorações das amostras A – F, indica possíveis variações nas concentrações de urucum dos CAs obtidos.

O Quadro 1 mostra as informações disponíveis sobre os principais ingredientes presentes nos CAs analisados, segundo as indicações de suas respectivas embalagens.

Quadro 1 - Informações disponíveis sobre os seus respectivos ingredientes dos coloríficos alimentares (CAs) A, B, C, D, E e F.

<b>CAs</b>	<b>Principais Ingredientes</b>
A	Fubá enriquecido com ferro e ácido fólico, suspensão oleosa de urucum, glúten, urucum
B	Sem informações disponíveis sobre seus ingredientes
C	Óleo de soja e derivados de soja, urucum
D	Fubá enriquecido com ferro e ácido fólico, possível presença de soja, amendoim, trigo, castanha de caju, castanha do Pará e castanhas, corante de urucum
E	Fubá, urucum
F	Sem informações disponíveis sobre seus ingredientes

Fonte: autores.

Como as amostras B e F, foram obtidas na feira livre, os seus respectivos CAs são vendidos nas quantidades que os consumidores desejam comprar e, conseqüentemente, não possuem embalagens ou rótulos, que possuam informações sobre seus respectivos ingredientes. Porém, ao analisar os ingredientes das amostras A, C, D e E, pode-se observar, que a maioria possui óleo de soja e que todos possuem fubá. Sendo assim, além dos espectros infravermelhos do urucum e das amostras A, B, C, D, E e F, dos CAs comercializados, que contém o urucum, espectros de amostras de fubá e de óleo de soja também foram obtidos.

A técnica de FTIR-UATR foi utilizada para obter os espectros de absorção no infravermelho de todas as amostras. Foram obtidos e analisados 5 espectros para cada uma das amostras, totalizando 45 espectros, na faixa de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , no modo de reflexão, com 32 varreduras por espectro, a uma temperatura controlada de 20 °C, utilizando o espectrofotômetro Spectrum Spotlight 400 FTIR, da PerkinElmer.

Todos os espectros obtidos foram processados, utilizando o software Spectrum 5.3 e 10.3 (ambos da PerkinElmer), onde foram realizadas as correções de linha de base, a suavização espectral utilizando o algoritmo Savitzky Golay (9 pontos), a conversão dos espectros em transmitância em espectros em absorbância e normalização dos espectros, em absorbância, nessa exata ordem. A normalização foi realizada considerando a intensidade da banda mais acentuada como uma unidade.

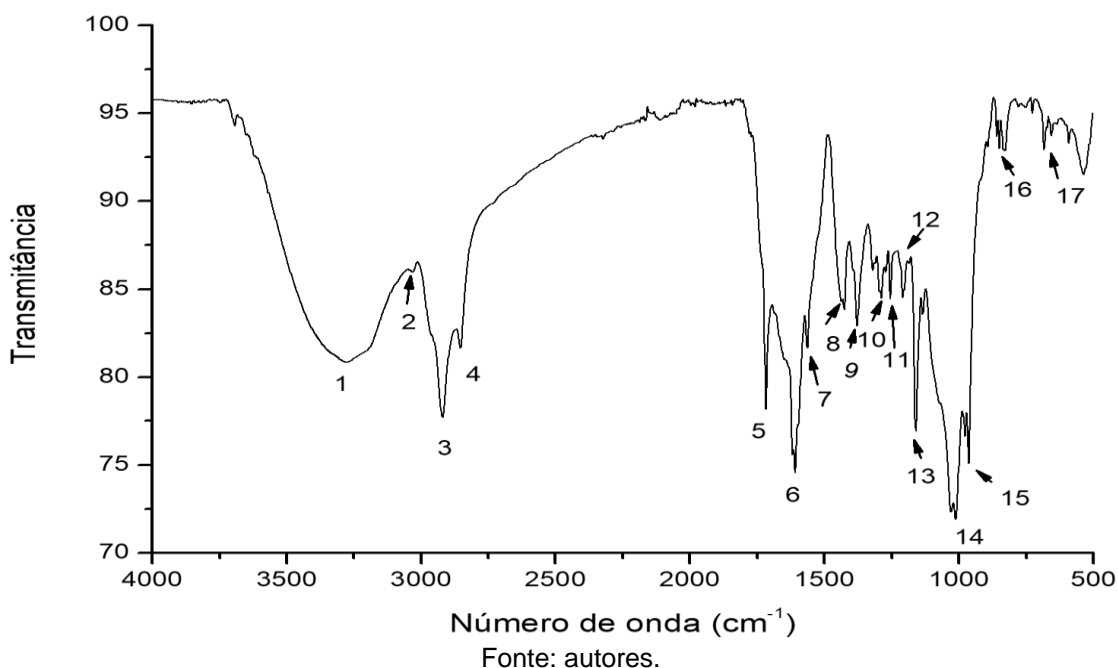
O software Origin 8.5 foi utilizado para construção dos gráficos e para a ANOVA e o software Minitab 8.0, para a realizar as análise estatísticas multivariadas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 ESPECTRO INFRAVERMELHO MÉDIO DO URUCUM E SUAS ATRIBUIÇÕES APROXIMADAS.

A Figura 2 mostra o espectro infravermelho médio do urucum, em transmitância, com numeração de suas bandas características, sendo que, suas atribuições aproximadas, baseadas na literatura, estão demonstradas no Quadro 2.

Figura 2 - Espectro infravermelho médio, em transmitância, do urucum, com os picos que foram atribuídos e numerados.



Quadro 2 - Modos vibracionais e atribuições aproximadas do espectro médio do urucum.

Nº	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Modos vibracionais e atribuições aproximadas
1	3277	Estiramento da ligação O-H do grupo COOH
2	3010	Estiramento da ligação =C-H sp <sup>2</sup>
3	2919	Estiramento assimétrico da ligação C-H sp <sup>3</sup>
4	2852	Estiramento simétrico da ligação C-H sp <sup>3</sup>
5	1716	Estiramento da ligação C=O do grupo COOH
6	1608	Estiramento da ligação C=O do grupo COOR
7	1562	Estiramento da ligação C=C dos dienos conjugados
8	1425	Deformação angular assimétrica no plano da ligação C-H
9	1377	Deformação angular simétrica no plano da ligação C-H
10	1288	Combinação da deformação angular de OH e do estiramento C-O
11	1254	Combinação da deformação angular de OH e do estiramento C-O

12	1209	Combinação da deformação angular de OH e do estiramento C-O
13	1159	Estiramento da ligação C-O do grupo COOH
14	1011	Estiramento da ligação C-O do grupo COOR
15	962	Deformação angular fora de plano da C-H sp <sup>2</sup>
16	827	Deformação angular fora de plano C-H sp <sup>3</sup>
17	682	Deformação angular fora do plano de O-H

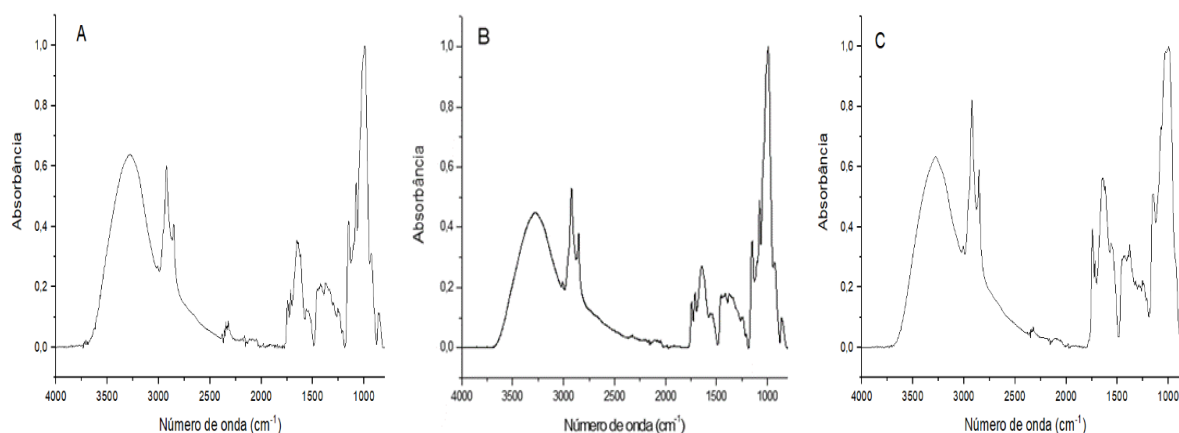
Fonte: Barbosa (2007); Smith (2011); Fontinele et al. (2018); Costa et al. (2023).

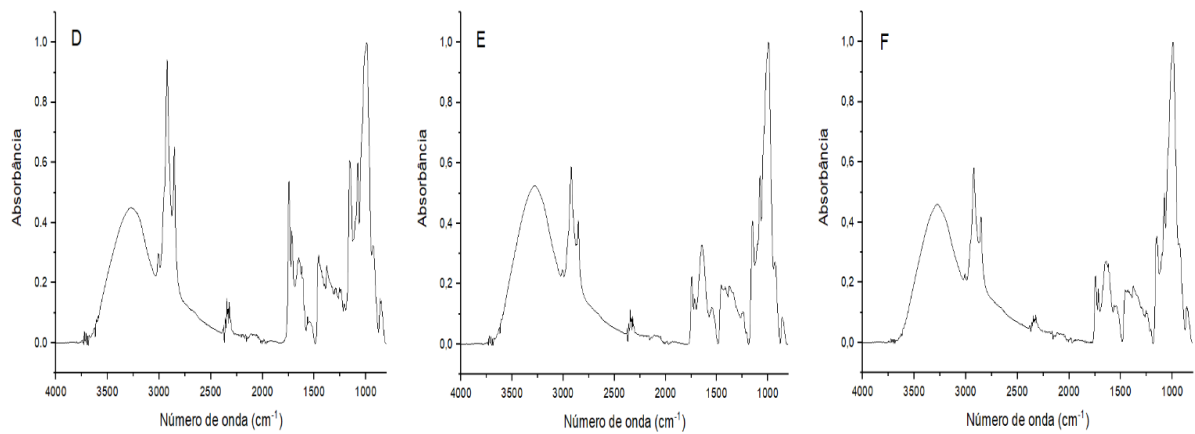
As bandas dos modos vibracionais do estiramento da ligação O-H juntamente as de estiramento da ligação C-H sp<sup>3</sup>, são encontradas na região de 3300 a 2800 cm<sup>-1</sup>. O alargamento da banda em 3277 cm<sup>-1</sup>, indica forte interação intermolecular através da ligação O-H. A banda em 1716 cm<sup>-1</sup> é atribuída como carbonila do éster, indicativo da presença de bixina (Costa et al., 2023). Além disso, também são encontradas as bandas de estiramento da ligação C=C, estiramento da ligação C-O, deformação angular da ligação C-H, estiramento C-H sp<sup>2</sup>.

### 3.2 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS INFRAVERMELHOS DAS AMOSTRAS DOS COLORÍFICOS ALIMENTÍCIOS CONTENDO URUCUM.

Os espectros infravermelhos médios, em absorvância e normalizados, das amostras A – F, dos CAs contendo urucum, estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Espectros infravermelhos médio, em absorvância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios, contendo urucum.

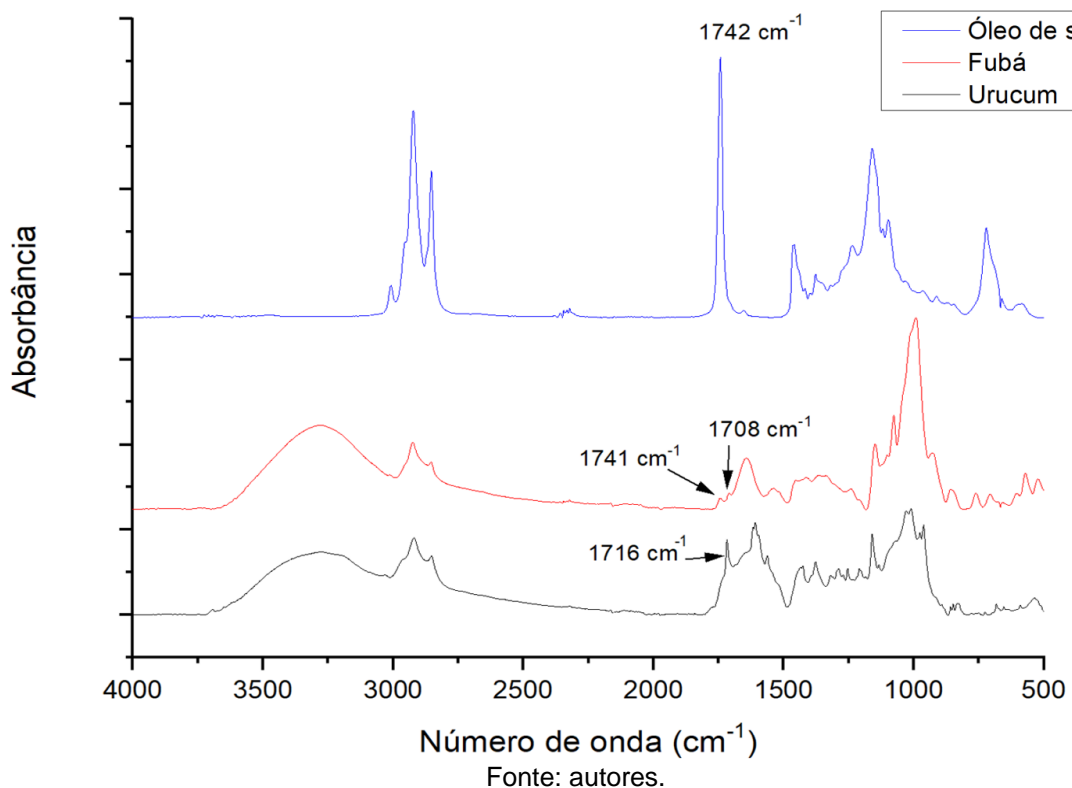




Fonte: autores.

Com finalidade de identificar as bandas do urucum nos espectros dos CAs, os espectros médios do fubá e do óleo de soja foram obtidos e comparados pico a pico com o do urucum, uma vez que, ambos ingredientes estão presentes na maioria das amostras obtidas (Quadro 1). A comparação visual dos espectros infravermelhos médios, em absorvância, do urucum, do fubá e do óleo de soja, está apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Comparação visual dos espectros médios, em absorvância, do óleo de soja, do fubá e do urucum.



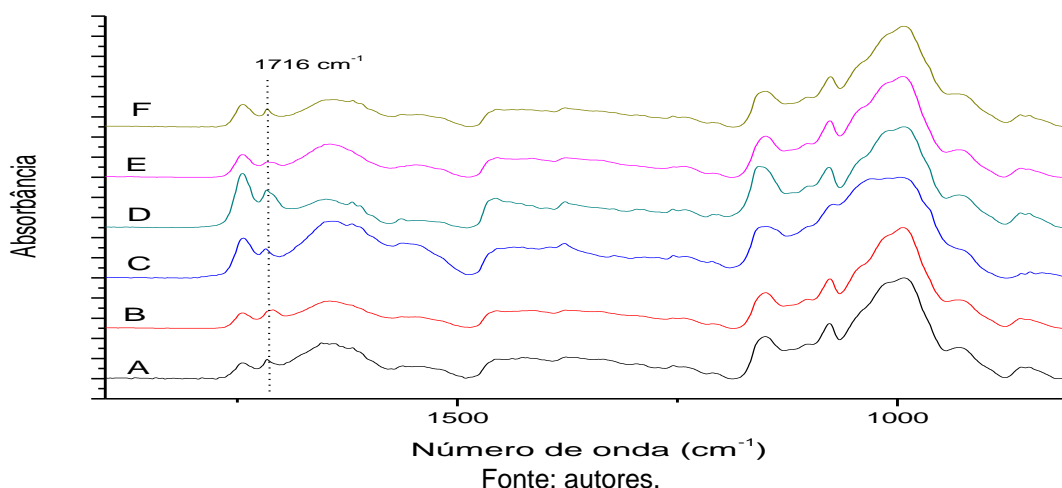
Fonte: autores.

Observa-se que o espectro médio do óleo de soja possui uma banda intensa em  $1742\text{ cm}^{-1}$  e o de fubá possui duas bandas nesta região, uma em  $1741\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1708\text{ cm}^{-1}$ . Como a resolução do espectrofotômetro utilizado é de  $4\text{ cm}^{-1}$ , conclui-se que, estes dois excipientes, não possuem uma banda em  $1716\text{ cm}^{-1}$ . Portanto,



como a banda em  $1716\text{ cm}^{-1}$  está presente somente no espectro médio do urucum, ela pode ser utilizada como uma banda marcadora que indica a presença do urucum nos CAs. Por fim, para verificar a presença e o contorno da banda marcadora do urucum, localizada em  $1716\text{ cm}^{-1}$ , a Figura 5 apresenta a superposição dos espectros médios, em absorbância, das amostras A – F, dos CAs obtidos.

Figura 5 - Superposição dos espectros infravermelhos médios, em absorbância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios contendo urucum.



Pode-se observar na Figura 5 que, visualmente, os contornos de bandas e o número de picos se assemelham, tornando difícil detectar as diferenças espectrais entre as amostras A, B, C, D, E e F. Observa-se, também, que a alteração das intensidades relativas das bandas em  $1750\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser correspondentes as bandas do óleo de soja e do fubá (Figura 4) e nas bandas localizadas na região de  $1100$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ , apresentam variações nas suas intensidades relativas e contornos, o que sugere variações na composição dos CAs analisados. Desta forma é necessário recorrer a cálculos matemáticos e estatísticos para discutir os graus de similaridade entre os espectros das amostras A – F.

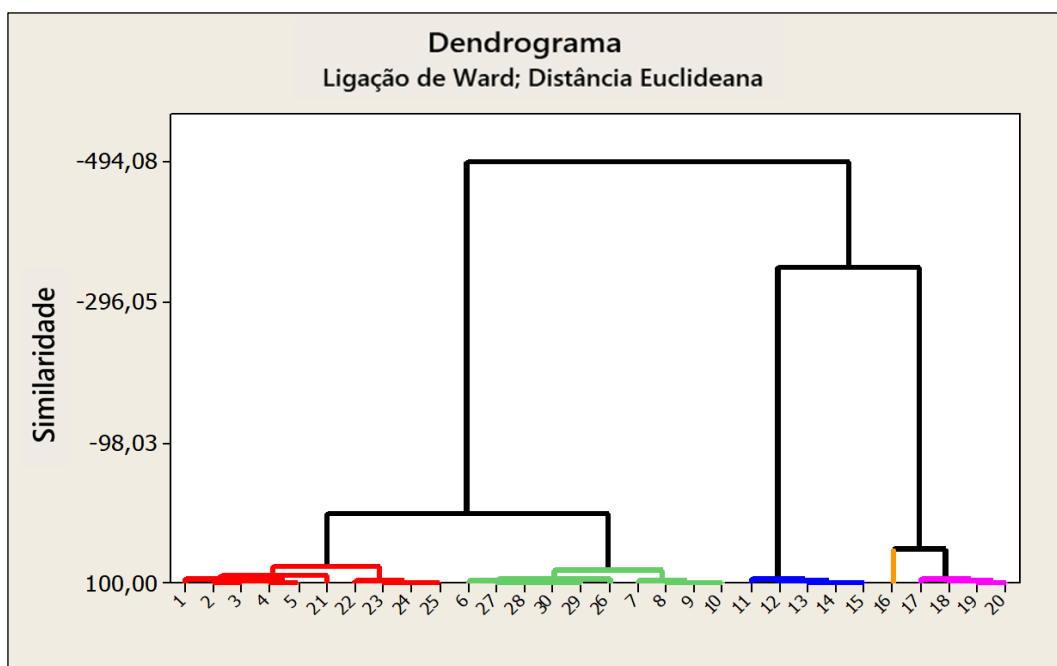
### 3.3 ESTUDO DA SIMILARIDADE DOS COLORÍFICOS ALIMENTÍCIOS DENTRO DE SEUS RESPECTIVOS PRAZOS DE VALIDADE.

Para as análises de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos (HCA), foram utilizados cinco espectros para cada um das amostras (A – F), sendo que, todos os espectros analisados já estavam em absorbância e normalizados.

As regiões dos espectros que foram analisadas pela HCA, para obter o dendrograma apresentado na Figura 6, foram a de  $3000$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$  e  $1800$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ , sendo que, a numeração dos espectros das amostras analisadas pela HCA, foi realizada na seguinte forma:

- Espectros da amostra A: 1 a 5
- Espectros da amostra B: 6 a 10
- Espectros da amostra C: 11 a 15
- Espectros da amostra D: 16 a 20
- Espectros da amostra E: 21 a 25
- Espectros da amostra F: 26 a 30

Figura 6 - Dendrograma das regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , dos espectros infravermelhos, em absorvância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios contendo urucum.



Fontes: autores.

Observa-se no dendrograma, da Figura 6, a formação de quatro agrupamentos principais, sendo importante também notar a similaridade entre os espectros da amostra A (1 a 5), que se agruparam com os da amostra E (21 a 25) e, especialmente, entre os espectros das amostras B (6 a 10), que se agruparam com os da amostra F (26 a 30), uma vez que, as amostras B e F, são as únicas duas amostras pertencentes a CAs adquiridos em uma feira livre. Os coeficientes de similaridades dos principais agrupamentos, estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Coeficientes de similaridade do dendrograma das regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , dos espectros infravermelhos em absorvância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios contendo urucum.

Amostra	Numeração dos espectros	Similaridade do agrupamento (%)
A e E	(1 a 5) e (21 a 25)	76,90
B e F	(6 a 10) e (26 a 30)	82,84
(A e E) e (B e F)	(1 a 5 e 21 a 25) e (6 a 10 e 26 a 30)	4,02
C	(11 a 15)	95,71
D	(16 a 20)	53,33
C e D	(11 a 15) e (16 a 20)	-344,64
A, B, C, D, E e F	(1 a 30)	-494,08

Fonte: autores.

Baseando-se nos dados apresentados no Quadro 3, observa-se que os espectros da amostra C (11 a 15) formaram o agrupamento com espectros de somente um CA, com a maior similaridade entre si. Além dos espectros da amostra

C, os espectros da amostra D (16 a 20), foram os únicos espectros que também formaram um agrupamento isolado, porém, apresentaram uma similaridade inferior à do agrupamento dos espectros da amostra C. É importante lembrar que, conforme o Quadro 1, a amostra D, é a amostra que possui a maior variedade de ingredientes. Portanto, sugere-se que a diversidade de ingredientes presentes na amostra D contribuiu na discriminação de seus espectros e, conseqüentemente, diminuído a similaridade de seu agrupamento.

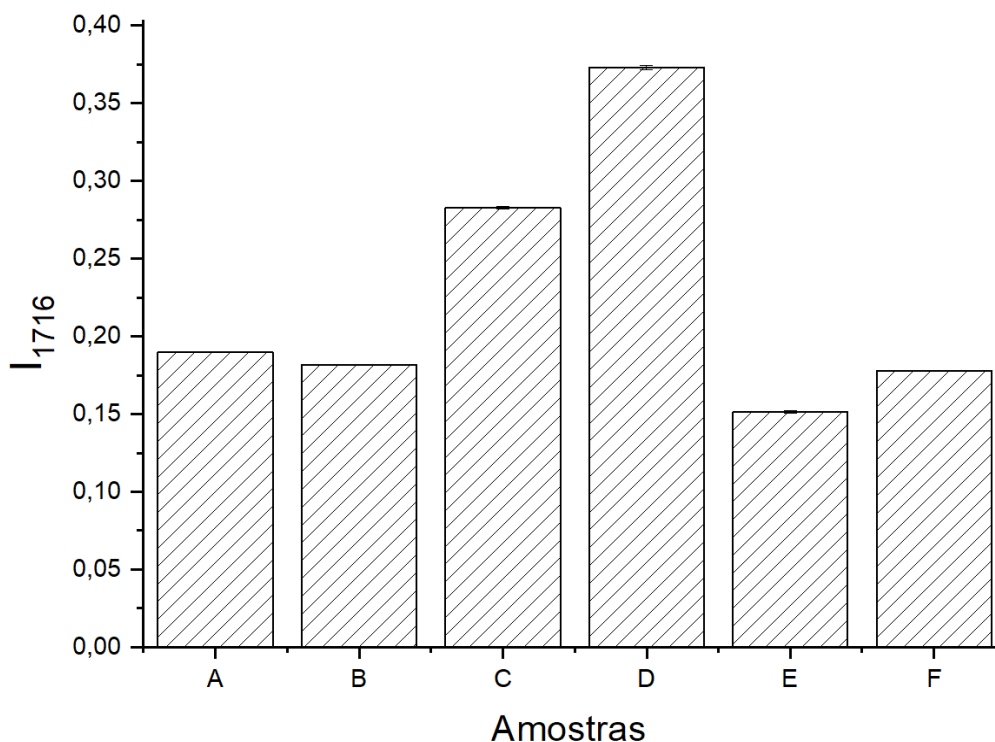
Observando os espectros da Figura 5, pode-se notar que a intensidade relativa da banda marcadora do urucum, localizada em  $1716\text{ cm}^{-1}$ , varia entre os espectros das amostras A, B, C, D, E, F. Sabe-se que a intensidade de uma banda em um espectro infravermelho, em absorvância, pode se relacionar com a quantidade de um determinado composto presente na amostra. O cálculo de intensidade relativa da banda marcadora, localizada em  $1716\text{ cm}^{-1}$ , foi realizado, com objetivos de verificar o teor de urucum utilizados na preparação dos CAs obtidos, sendo que, os resultados desse cálculo para as amostras A, B, C, D, E e F, estão apresentados no Quadro 4 e na Figura 7.

Quadro 4 - Intensidade relativa da banda  $1716\text{ cm}^{-1}$ , nos espectros infravermelhos médios, em absorvância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios contendo urucum.

<b>Amostras</b>	<b>I<sub>1716</sub></b>	<b>Desvio Padrão</b>
A	0,19000	0,0003
B	0,18183	0,0002
C	0,28277	0,0009
D	0,37313	0,0015
E	0,15113	0,0007
F	0,17783	0,0002

Fonte: autores.

Figura 7 - Histograma das intensidades relativas da banda  $1716\text{ cm}^{-1}$ , nos espectros infravermelhos médios, em absorbância e normalizados, das amostras A, B, C, D, E e F, dos coloríficos alimentícios contendo urucum.



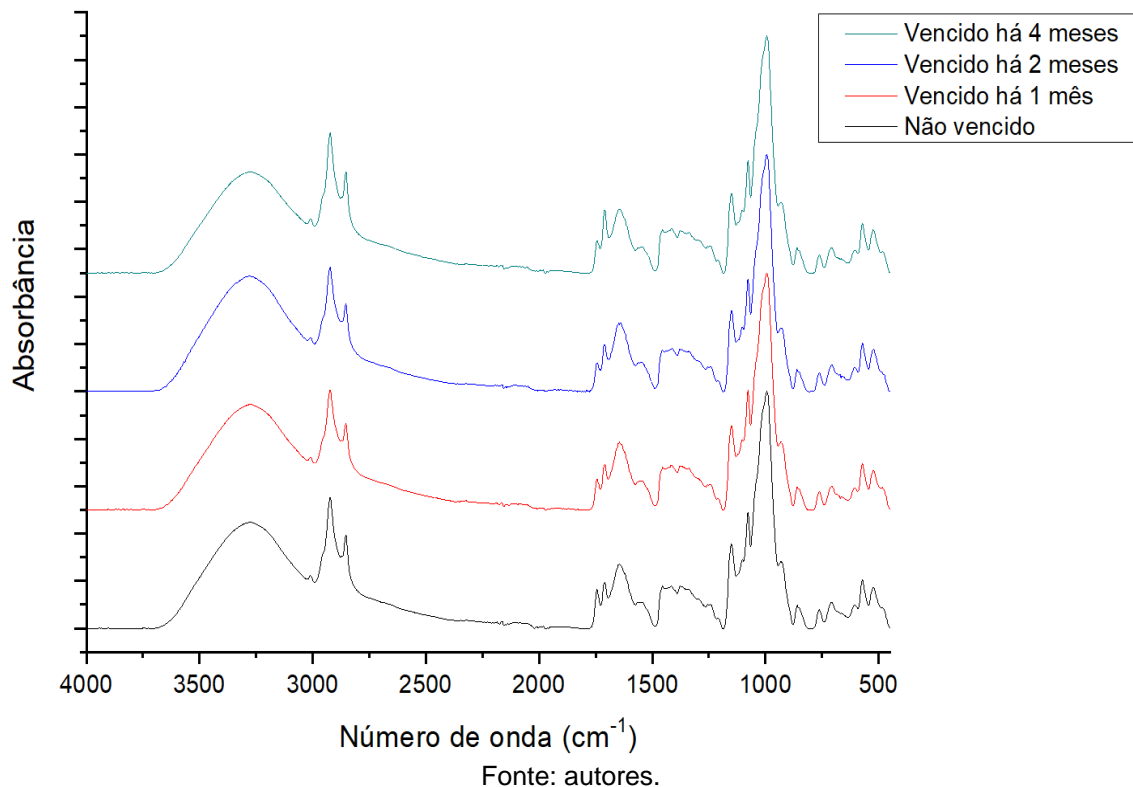
Fonte: autores.

Observa-se no Quadro 4, que as bandas de  $1716\text{ cm}^{-1}$  mais intensas, pertencem as amostras C e D. Utilizando a Figura 7 e o Quadro 4, pode-se demonstrar, que as intensidades relativas da banda  $1716\text{ cm}^{-1}$  das amostras C e D, em relação as das outras amostras e entre si, possuem diferenças estatisticamente significativas.

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS DE UM COLORÍFICO ALIMENTÍCIO CONTENDO URUCUM, ANTES E APÓS SEU PRAZO DE VALIDADE.

Com o objetivo de verificar se haveria alterações espectrais com o decorrer do tempo, após o prazo de validade de um dos CAs, foram obtidos cinco espectros do CA B, dentro de seu prazo de validade, vencido há 1 mês, vencido há 2 meses e vencido há 4 meses, gerando um total de 20 espectros, que tiveram seus respectivos espectros médios apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Superposição espectros infravermelhos, em absorbância e normalizados, do colorífico alimentício B dentro e fora do seu prazo de validade.

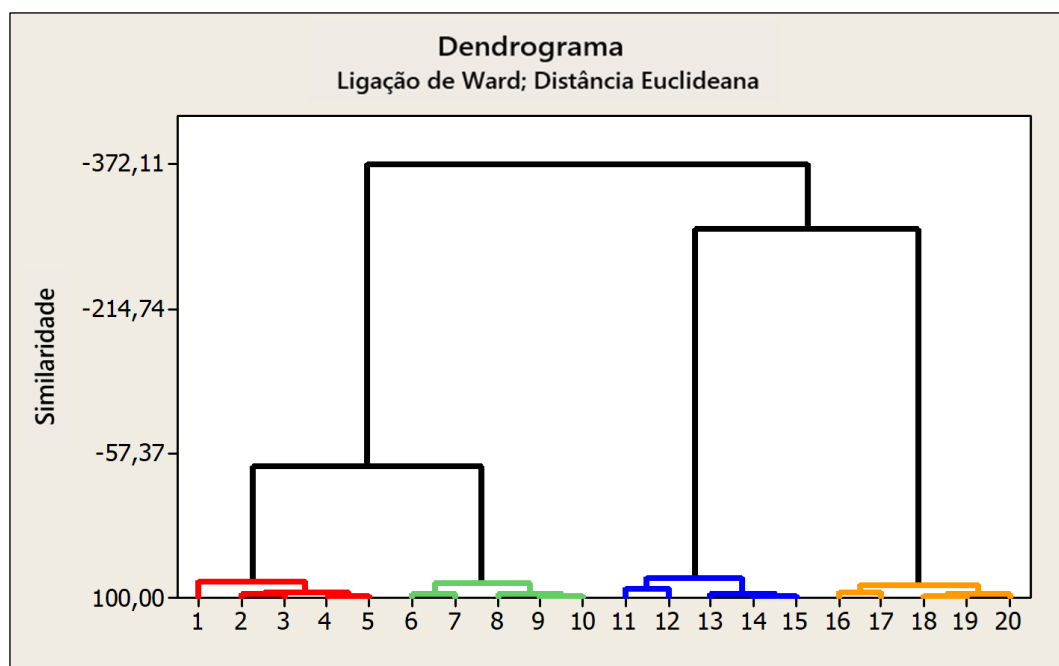


Observa-se que os espectros apresentados na Figura 8, possuem número de picos e o contorno de bandas semelhantes e não apresentam o aparecimento ou desaparecimento de bandas, o que dificulta sua diferenciação utilizando apenas uma inspeção visual. No entanto, observam-se variações de intensidades relativas em algumas bandas na região de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, para verificar se estas diferenças são estatisticamente significativas, torna-se necessário recorrer aos cálculos matemático e estatístico, para que se possa discutir os graus de semelhança entre os espectros.

Utilizando as análises estatísticas multivariadas HCA e PCA, nas regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e de 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , dos espectros infravermelhos médios, em absorbância e normalizados, do CA B, dentro e fora de seu prazo de validade, obteve-se o dendrograma apresentado na Figura 9, sendo que, os espectros analisados foram numerados na seguinte forma:

- Espectros do CA B dentro do seu prazo de validade: 1 a 5;
- Espectros do CA B vencido há 1 mês: 6 a 10;
- Espectros do CA B vencido há 2 meses: 11 a 15;
- Espectros do CA B vencido há 4 meses: 16 a 20.

Figura 9 - Dendrograma das regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e de 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , dos espectros infravermelhos, em absorbância e normalizados, do colorífico alimentício B dentro e fora do seu prazo de validade.



Fonte: autores.

O dendrograma apresentado na Figura 9, apresenta uma separação perfeita dos espectros em quatro agrupamentos, pois todos os agrupamentos são compostos somente por espectros retirados da mesma amostra, indicando que todas as regiões analisadas possuem diferenças estatisticamente significativas entre si, incluindo as regiões dos espectros do CA B vencido há apenas 1 mês.

As variações responsáveis pela separação perfeita dos espectros (Figura 9), são geradas em um processo natural causado pela interação do CA B com o ar atmosférico e pela incorporação de sua umidade, assim como, pela influência da luminosidade do ambiente em que o CA B foi armazenado. Essas alterações espectrais indicam que possíveis variações estruturais na composição biomolecular do CA B, podem ocorrer ao decorrer do tempo, após seu prazo de validade.

Para analisar, minuciosamente, as similaridades entre os agrupamentos apresentados na Figura 9, os coeficientes de similaridade destes agrupamentos estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Coeficientes de similaridade do dendrograma das regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , dos espectros infravermelhos, em absorbância e normalizados, do colorífico alimentício B dentro e fora do seu prazo de validade.

Amostra	Numeração dos espectros	Similaridade do agrupamento (%)
Dentro do prazo de validade	(1 a 5)	93,55
Vencido há 1 mês	(6 a 10)	85,31
Dentro do prazo de validade Vencido há 1 mês	(1 a 5) e (6 a 10)	-41,95
Vencido há 2 meses	(11 a 15)	78,02
Vencido há 4 meses	(16 a 20)	86,57
Vencido há 2 mês Vencido há 4 meses	(11 a 15) e (16 a 20)	-301,66
Todas as amostras (dentro e fora do prazo de validade)	(1 a 20)	-372,11

Fonte: autores.

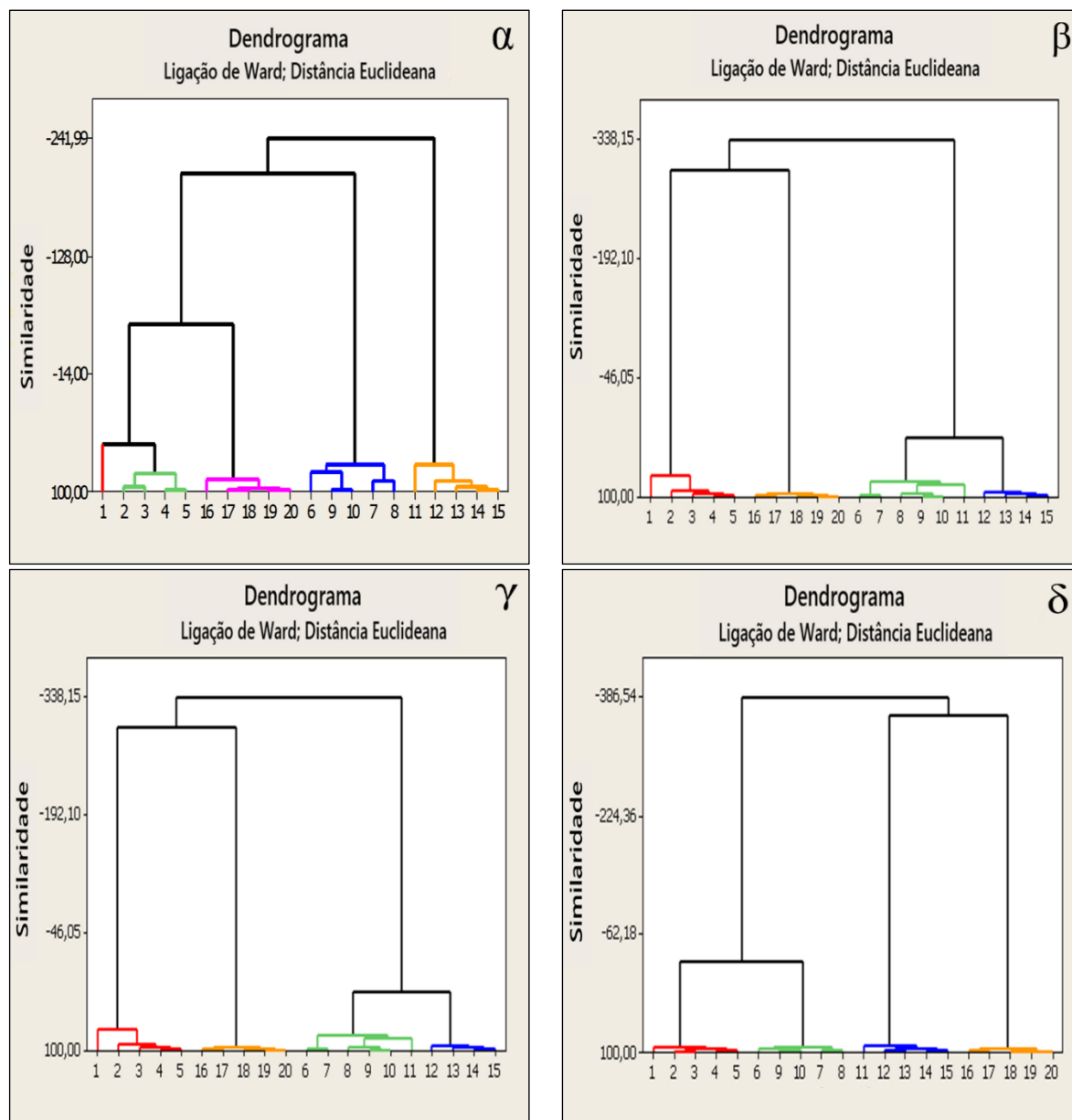
Tendo em mente, que um coeficiente de similaridade negativo indica que não há similaridade entre dois agrupamentos, ao analisar os resultados apresentados no Quadro 5, pode-se observar que, além de todos os principais agrupamentos formados serem estatisticamente diferentes, suas diferenças aumentam cada vez mais rapidamente ao passar do tempo, uma vez que, o coeficiente de similaridade entre os agrupamentos dos espectros do CA B vencido há 2 meses e há 4 meses (- 301,66 %), é aproximadamente sete vezes menor do que o coeficiente de similaridade dos agrupamentos dos espectros do CA B dentro do seu prazo de validade e vencido há 1 mês (- 41,95 %).

Com o intuito de determinar qual região mais contribuiu para a separação perfeita dos espectros do CA B dentro e fora de validade (Figura 9), as regiões de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , foram analisadas novamente, utilizando a HCA, separadamente, nas seguintes regiões:

- Região de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ :  $\alpha$
- Região de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ :  $\beta$
- Região de 1499 a 1190  $\text{cm}^{-1}$ :  $\gamma$
- Região de 1189 a 800  $\text{cm}^{-1}$ :  $\delta$

Os dendrogramas obtidos, utilizando a HCA nas regiões  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dos espectros infravermelhos, em absorbância e normalizados, do CA B, dentro e fora do seu prazo de validade, estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Dendrograma das regiões  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dos espectros infravermelhos, em absorbância e normalizados, do colorífico alimentício B dentro e fora de seu prazo de validade.



Fonte: autores.

Observa-se que o dendrograma da região  $\delta$  (1189 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ) da Figura 10, é mais semelhante ao da Figura 9, que analisa a região 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  e de 1800 a 800  $\text{cm}^{-1}$ . Na região  $\delta$  (1189 a 800  $\text{cm}^{-1}$ ), encontram-se as bandas mais intensas, dos modos vibracionais da ligação C-O, presentes no espectro infravermelho do CA B. Portanto, sugere-se que a região  $\delta$ , foi a que apresentou a maior contribuição na discriminação dos espectros do CA B, dentro e fora de seu prazo de validade.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A banda analítica em  $1716\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a vibração da ligação C=O do grupo COOH, no espectro infravermelho do urucum, permitiu a sua identificação nos CAs obtidos, sem necessitar sua extração dos CAs.

A utilização de análises estatísticas multivariadas, possibilitou a discriminação dos espectros dos seis CAs obtidos. Mostrou-se que o agrupamento dos CAs (A e E) e (B e F), apresentaram um coeficiente de similaridade igual a 76,90 % e 82,84 %, respectivamente. O maior coeficiente de similaridade, de um agrupamento constituído, por todos os espectros de somente um CA, foi encontrado no agrupamento do CA D, que apresentou um valor igual a 95,71 %, sendo assim, o agrupamento com a maior homogeneidade entre seus espectros. O cálculo de intensidade relativa da banda de  $1716\text{ cm}^{-1}$ , indicou que as amostras dos CAs estudadas, apresentam concentrações diferentes de urucum, sendo a maior intensidade relativa encontrada no espectro do CA D.

As técnicas espectroscópicas FTIR-UATR, acopladas a análises estatísticas multivariadas, demonstraram que o CA B, após seu prazo de validade, sofreu alteração ao longo do tempo, que foram influenciadas, principalmente, pela interação do CA B com o ar atmosférico, pela incorporação de umidade e pela luminosidade, do local onde foi armazenado. Utilizando a HCA, também foi possível determinar, que foi a região espectral região de  $1189\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$  que mais contribuiu para diferenciação dos espectros do CA B, antes e após seu prazo de validade.

O presente trabalho mostra o potencial do uso das técnicas espectroscópicas FTIR-UATR, acopladas a análises estatísticas multivariadas, na análise de qualidade de alimentos, pois, como foi demonstrado, essas técnicas podem ser utilizadas para criar um método de análise de qualidade rápido, eficiente, preciso e não destrutivo.

#### REFERÊNCIAS

- Balan, D. de S. L. (2017). Corantes naturais de aplicação têxtil: Avaliação preliminar da toxicidade de urucum *Bixa orellana* L. (Malvales: *Bixaceae*) e hibisco *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvales: *Malvaceae*). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 4(7), 151–157. <https://doi.org/10.21438/RBGAS.040715>
- Baptistão, M., Lorençatto, R., Eberlin, M. N., & Simionato, A. V. C. (2023). Multielemental Characterization of *Bixa orellana* L.(urucum) Seeds by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Food and Bioprocess Technology*, 16(11), 2521-2530. <https://doi.org/10.1007/S11947-023-03073-6/FIGURES/4>
- Barbosa, L. C. de A. (2007). *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV.
- Carvalho, I. O. de, Xavier Júnior, F. A. F., Evangelista, J. S. A. M., Rodrigues, F. F. G., & Costa, J. G. M. da. (2022). Perfil químico, atividade antimicrobiana do extrato das sementes de urucum (*Bixa orellana*). *Conjecturas*, 22(2), 500–509. <https://doi.org/10.53660/CONJ-719-812>
- Chamone, M. E. R., Oliveira, A. A. S., Miguel, R. A., Queiroz, V. A. V., & Trombete, F. M. (2020). Extrato de bixina de sementes de urucum como corante natural na formulação de pipoca de micro-ondas: Avaliação sensorial e efeitos em

- determinados parâmetros de qualidade. *HOLOS*, 6(6), 1–14. <https://doi.org/10.15628/holos.2020.9818>
- Chisté, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C., & Mercadante, A. Z. (2011). Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *Journal of Chromatography A*, 1218(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.10.094>
- Constant, P. B. L., Silva, A. G. da, Borges, Â. da S., Melo, F. O., Fanchiotti, F. E., Silva, F. L. A. T. da, & Stringheta, P. C. (2021). Microencapsulation of annatto and stability evaluation's. *Research, Society and Development*, 10(9), e51910918179–e51910918179. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I9.18179>
- Costa, G. C. S., Arantes, T. M., Arantes, T. M., Resende, E. C., & De Oliveira, G. M. (2023). Hidrogeis Nanocompósitos de Alginato/Nanocelulose/Bixina. *Revista Virtual Química*, 2023, 1–10. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220126>
- de Araujo, M. K. D. C., de Araújo Júnior, C. R., Antunes, A. M., de Jesus Silva, R., & da Silva, M. A. P. (2019). Caracterização física das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), visando processos de pós-colheita. *Energia na Agricultura*, 34(4), 592–600. <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2019v34n4p592-600>
- da Silva, E. C., Coutinho, M. A. da S., Matos, A. Z. G., Damacena, D. H. L., Alves, A. L., da Silva, D., Viana, V. G. F., & Viana, D. dos S. F. (2020). Extração e caracterização térmica e mineralógica do corante extraído das sementes de urucum / Thermal and mineralogical extraction and characterization of dye extracted from urucum seeds. *Brazilian Applied Science Review*, 4(6), 3730–3737. <https://doi.org/10.34115/BASRV4N6-035>
- de Sousa, E. M. P., & de Faria, L. J. G. (2014). Extração e estabilidade do corante de urucum (*Bixa orellana* L.) em base cosmética. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 16(2), 195–204. <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v16n2p195-204>
- de Toledo, C. D., Teixeira, D. A., Archanjo, E. da V., Pereira, F. F., Siqueira, F. C., Mininel, F. J., de Lima, J. S., & Silveira, K. da M. (2021). Revisitação dos métodos de extração de pigmentos do urucum. *Revista de Ciências Exatas e Tecnologia*, 16(16), 24–29. <https://doi.org/10.17921/1890-1793.2021v16n16p24-29>
- Demczuk Jr, B., & Ribani, R. H. (2015). Updates on chemistry and use of annatto (*Bixa orellana* L.). *Brazilian Journal of Food Research*, 6(1), 37–50. <https://doi.org/10.14685/REBRAPA.V6I1.144>
- Ferreira, T., Galluzzi, L., de Paulis, T., & Farah, A. (2021). Three centuries on the science of coffee authenticity control. *Food Research International*, 149, 110690. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110690>
- Fontinele, L. P., de Sousa, R. C., Viana, V. G. F., Farias, E. A. de O., Queiroz, E. L., & Eiras, C. (2018). Norbixin extracted from urucum (*Bixa orellana* L.) for the

- formation of conductive composites with potential applications in electrochemical sensors. *Surfaces and Interfaces*, 13, 92–100. <https://doi.org/10.1016/J.SURFIN.2018.08.002>
- Furini, T., Karsburg, I. V., Fernandes, J. M., Domingues, S. C. de O., Barros, J. de O., Schmitt, J. P. M., Moreira, E. S., & Scatola, L. F. (2021). Phenotypic morphology of *Bixa arborea* and *Bixa orellana* (*Bixaceae*) in Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil. *Research, Society and Development*, 10(8), e54110817706–e54110817706. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I8.17706>
- Gonçalves, M. J., Oliveira Barcellos, I., De Cássia, R., Curto Valle, S., Benathar, L., & Tavares, B. (2020). Estudo da viabilidade do tingimento da poliamida com corante natural de urucum. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, 9(9), 571–585. <https://doi.org/10.19177/RGSA.V9E02020571-585>
- José, E., Lopes, S., Pereira Machado, R., Gonzales, F., Mundim, L., Rodrigues, A., & Mendonça, A. (2019). Padronização do corante natural extraído à partir do urucum (*Bixa orellana*) e sua aplicação na histologia. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 11(4), e241–e241. <https://doi.org/10.25248/REAS.E241.2019>
- Lucarini, A. C., Tabu, A. S. F. Z., Silva, F. de F. R. da, Moraes, G. de A., Piazon, G. I., & Zurawski, M. P. (2017). Estudo da extração de corante natural que confere proteção ultravioleta em fibras naturais. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 3(2), 082–094. <https://doi.org/10.18540/jcecvl3iss2pp082-094>
- Olegário, L. S., & dos Santos, J. A. B. (2014). Prospecção tecnológica sobre o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.). *Cadernos de Prospecção*, 7(4), 601–611. <https://doi.org/10.9771/S.CPROSP.2014.007.061>
- Ordoudi, S. A., Strani, L., & Cocchi, M. (2023). Toward the non-targeted detection of adulterated virgin olive oil with edible oils via FTIR Spectroscopy & Chemometrics: Research methodology trends, gaps and future perspectives. *Molecules*, 28(1), 337. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28010337/S1>
- Santos, N. S., Silva, F. L. A. T. da, & Leite Neta, M. T. S. (2022). Corantes naturais: Importância e fontes de obtenção. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*, 3(3), e331165. <https://doi.org/10.47820/recima21.v3i3.1165>
- Silva, Z. S., França, C. M., Araújo Prates, R., Botta, S. B., Ferrari, R. A. M., Ana, P. A., Pavani, C., Fernandes, K. P. S., de Fátima Teixeira da Silva, D., Hamblin, M. R., & Bussadori, S. K. (2020). The effects of photodynamic therapy with blue light and papain-based gel associated with urucum, on collagen and fibroblasts: a spectroscopic and cytotoxicity analysis. *Lasers in Medical Science*, 35(3), 767–775. <https://doi.org/10.1007/S10103-019-02857-7/TABLES/2>
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.
- Stuetz, W., Schlörmann, W., & Gleis, M. (2017). B-vitamins, carotenoids and  $\alpha$ - $\gamma$ -tocopherol in raw and roasted nuts. *Food Chemistry*, 221, 222–227.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.065>

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a FAPESP pela aquisição do software Spectrum 10.5 da PerkinElmer pelo processo 2017/04013-0.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Finanças 001.