**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de
bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e avaliação da atividade
antioxidante e antibacteriana *in vitro***

Marina Gagliardo Pires

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Marina Gagliardo Pires
Cientista de Alimentos

Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de bixina de sementes de urucum e avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CLAUDIO LIMA DE AGUIAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Pires, Marina Gagliardo

Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* / Marina Gagliardo Pires. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

74 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Carotenoides 2. Urucum 3. Bixina 4. Espectrometria I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar sabedoria para fazer minhas escolhas e me orientar para o melhor caminho;

A minha família, por sempre me apoiar nas minhas escolhas, por estar presente em cada etapa da minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar pela confiança em meu trabalho, por toda motivação, ajuda e pela amizade construída dentro desses anos de Laboratório;

Aos amigos queridos Nathalia, Lorenz, Gislene, Felipe, Graziela, Bruna, Guilherme, João, Layna pela ajuda durante o trabalho e pela amizade construída durante esses anos de convivência;

Aos técnicos do Laboratório, Pedrinho, Sylvino e Rose pela ajuda sempre que foi preciso;

Ao pessoal do Laboratório Thomson – Instituto de Química/UNICAMP, pela disponibilidade dos equipamentos e ajuda na realização de análises essenciais para complementação desse trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante o mestrado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
Referências.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Urucum.....	13
2.2. Importância econômica	14
2.3. Corantes naturais	16
2.4. Outros compostos	18
Referências.....	18
3. PERFIL QUÍMICO POR HPLC-PDA E ESI-ORBITRAP E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DE SEMENTES DE URUCUM (<i>Bixa orellana</i> L.)	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
3.1. Introdução.....	24
3.2. Desenvolvimento.....	25
3.2.1. Revisão Bibliográfica.....	25
3.2.2. Material e Métodos	26
3.2.2.1. Coleta das sementes de urucum	26
3.2.2.2. Extração de compostos bioativos das sementes de urucum	27
3.2.2.3. Análise de fenólicos totais pelo método do Folin-Ciocalteu	28
3.2.2.4. Análise de flavonoides totais pelo método de complexação com alumínio	28
3.2.2.5. Análise espectrofotométrica dos teores de carotenoides totais	28
3.2.2.6. Análise de identificação dos carotenoides por ESI Orbitrap	29
3.2.2.7. Análise cromatográfica do perfil de carotenoides por HPLC-PDA.....	29
3.2.2.8. Análise espectrofotométrica da absorção máxima em UV-Visível	30
3.2.2.9. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
3.2.2.9.1. Atividade antioxidante pelo método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (TAC).....	30
3.2.2.9.2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH [•]) ..	30
3.2.2.10. Análise estatística.....	31

3.2.3. Resultados e Discussão.....	31
3.3. Conclusão.....	41
Referências	42
4. CONVERSÃO DE BIXINA EM NORBIXINA COM IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA V-EASI E ANÁLISE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE URUCUM.....	49
Resumo.....	47
Abstract.....	47
4.1. Introdução	49
4.2. Desenvolvimento	51
4.2.1. Revisão Bibliográfica	51
4.2.1.1. Corante natural de urucum	51
4.2.1.2. Espectrometria de massas	54
4.2.1.3. Atividade antibacteriana	57
4.2.2. Material e métodos	58
4.2.2.1. Condições reacionais	58
4.2.2.2. Análise por LCMS - V-EASI para confirmação e identificação dos compostos.....	59
4.2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	59
4.2.2.3.1. Método de Difusão em Ágar	59
4.2.2.3.2. Preparo da amostra	60
4.2.2.3.3. Preparo do inóculo.....	60
4.2.2.3.4. Preparo do teste	58
4.2.3. Resultados e discussão.....	61
4.2.3.1. Efeito de condições reacionais sobre a redução na absorbância referente à bixina.....	61
4.2.3.2. Atividade antibacteriana	68
4.3. Conclusão.....	69
Referências	69

RESUMO

Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*

Com a demanda cada vez maior por corantes alimentícios não tóxicos e sustentáveis, fontes naturais têm emergido como uma potencial alternativa aos corantes sintéticos artificiais. O urucum, planta tropical, tem sido cada vez mais explorado para suprir as demandas por corantes naturais, visto que sua semente apresenta uma alta concentração de carotenoides com poder colorífico. O Brasil que já era grande produtor de urucum tem sido destaque na produção de suas sementes para extração de pigmentos, devido à alta na demanda por corantes de origem natural. Das sementes do urucum é possível a extração de dois dos principais compostos para fabricação de corantes - bixina e norbixina. Visando contribuir para o melhor entendimento das potencialidades das sementes de urucum, além de fornecer evidência experimental sobre as propriedades antioxidantes e conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, foram determinados o perfil químico, o potencial antioxidante a partir de extratos de sementes de urucum, bem como a caracterização do carotenoide bixina por HPLC-PDA e ESI-Orbitrap. Sendo assim possível observar que o perfil químico e os teores de compostos bioativos em sementes de urucum não apresentam diferença independente da região produtora. Por fim, o projeto de pesquisa focou na conversão de bixina (carotenoide lipossolúvel que representa 80% do total de carotenoides presentes na semente) em norbixina (carotenoide solúvel em água) para suprir o aumento de demanda por corantes hidrossolúveis, visto que a indústria de alimentos tem visado a redução de gorduras nos alimentos.

Palavras-chave: Carotenoides; Bixina; Norbixina; Antioxidante; Espectrometria de massas

ABSTRACT

Increase yield of norbixin by physicochemical processes from bixin of annatto seeds (*Bixa orellana* L.) and antioxidant and antibacterial activity *in vitro*

With the increasing demand for non-toxic and sustainable food coloring, natural sources have appeared as a potential alternative to artificial synthetic dyes. The tropical plant known as annatto has been increasingly exploited to attend the demands for natural colorings as its seed are rich in carotenoids with high coloring potential. Brazil already considered a big producer of annatto seeds has been prominent in the production of its seed for extraction of its pigments, due to increasingly demand for natural-source food coloring. From annatto seeds it is possible to extract two of the main compounds for fabrication of coloring – bixin and norbixin. In order to a better understanding of the potential of annatto seeds as well as providing experimental evidence on the antioxidant properties and content of phenolic, flavonoids and carotenoids, the chemical profile, antioxidant potential as well as the characterization of bixin carotenoid by HPLC-PDA and ESI-Orbitrap, were determined from annatto seeds extract. It was found that the chemical profile and the content of bioactive compounds in annatto seeds did not differ independently of its producing site. In addition, the research foccused on the conversion of bixin (liposoluble carotenoid, responsible for 80% of the seeds' carotenoids) into norbixin (water soluble carotenoid) to attend the demand for water-soluble coloring, as the food industry has been aiming a reduction in food fat content.

Keywords: Carotenoids; Bixin; Norbixin; Antioxidants; Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes da planta de urucuzeiro.....	13
Figura 2. Estruturas químicas da (a) bixina, (b) trans-norbixina e (c) cis-norbixina.....	17
Figura 3. Distribuição geográfica de área cultivada de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.) na região oeste do estado de São Paulo, Brasil	27
Figura 4. Cromatograma por HPLC-PDA e espectro UV relativo à bixina em PDA e espectro em ESI-MS.....	37
Figura 5. Espectros de absorção máxima vs. comprimento de onda dos extratos de sementes de urucum em acetona.....	38
Figura 6. Espectros de absorção máxima na região UV-visível de três grupos característicos de extratos acetônicos de sementes de urucum.....	407
Figura 7. Análise de cluster (metodologia de Ward) das amostras de urucum com base nos espectros de absorção máxima na região UV-Visível.	39
Figura 8. Esquema representativo simplificado da biossíntese da bixina.....	50
Figura 9. Mecanismo funcionamento V-EASI	524
Figura 10. Comportamento de soluções a 0,5 M de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) durante reação de saponificação e suas respectivas equações de coeficiente angular. 61	
Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de hidróxido de potássio (0,25 M, 0,5 M e 0,75 M) sobre a conversão de bixina em extratos de sementes de urucum em acetona.	62
Figura 12. Comportamento da base hidróxido de sódio com concentração 0,5 M em diferentes temperaturas de 30 e 70°C.....	63
Figura 13. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro do tempo inicial	63
Figura 14. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro após 60 minutos de reação	63
Figura 15. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro 0 minutos de reação .	64
Figura 16. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro após 120 minutos de reação	64
Figura 17. Placas da avaliação da atividade antioxidante.	68

1. INTRODUÇÃO

O mercado de aditivos coloridos tem se tornado bastante expressivo, tanto pela produção e utilização pelas indústrias, quanto pelas discussões geradas sobre eles. A cor é um recurso de grande valor para a elaboração de um produto e diretamente associado a sua marca. Podem ser usados corantes sintéticos ou naturais, destacando-se que a utilização de corantes naturais tem apresentado um aumento considerável (CONSTANT *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2017).

O mercado mundial de corantes naturais gira em torno de 700 milhões de euros, com taxa de crescimento anual de 10%. Sendo que desse total 350 milhões de euros são provenientes de carotenoides. Atualmente 30% dos alimentos e bebidas fazem uso desses corantes naturais (RYMBAI *et al.*, 2011).

A principal fonte de carotenoides utilizados como corantes naturais de cores que vão do amarelo, vermelho e laranja são oriundos do urucum, sendo eles os mais utilizados por ser um dos poucos aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BASTOS *et al.*, 1999).

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta que tem origem na América tropical, principalmente das regiões amazônicas, de grande importância econômica no Brasil. Atualmente, os principais países produtores de urucum são Brasil, Peru e Quênia, sendo o Brasil o maior produtor e exportador dos corantes naturais extraídos dessa planta (MANTOVANI *et al.*, 2013; BARBOSA-FILHO, 2006).

O urucum ganhou destaque com o aumento da demanda das indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e têxteis por corantes naturais. Dentre os compostos colorantes extraídos a partir das sementes de urucum se destacam a bixina e norbixina (BOUVIER *et al.*, 2003; BARBOSA-FILHO, 2006).

A bixina representa 80% do total de carotenoides encontrado nas sementes, sendo este utilizado em 80% das preparações de corantes naturais. Já a norbixina, é encontrada diretamente nas sementes, no entanto em quantidades pequenas (LIMA, 2001).

Uma vez que os corantes de urucum podem ser preparados através da bixina ou norbixina, tendo elas propriedades lipossolúveis e hidrossolúveis, respectivamente, ele pode ser empregado em vasto número de produtos e preparações alimentícias. Estima-se que mais de 2,8 toneladas/ano de bixina e norbixina sejam consumidos em alimentos como o iogurte,

recheios de biscoitos, bebidas lácteas entre outras aplicações não alimentícias (FRANCO *et al.*, 2002).

Também, a norbixina tem se destacado pela sua propriedade hidrofílica, visto que muitos produtos onde são utilizados aditivos colorantes necessitam que os mesmos sejam miscíveis e apresentem melhor solubilidade em água. Além disso, sua propriedade particular também se destaca devido à alta busca por redução de gorduras em alimentos, demandando aditivos que se adequem a esta nova formulação (O'SULLIVAN, 2017; ATKINSON, 2011).

Além da bixina e norbixina, as sementes de urucum apresentam em média 3,5% de outros pigmentos (OLIVEIRA, 2005), destacando-se compostos fenólicos os quais potencializam o efeito benéfico à saúde humana, como mostram estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro*, tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (BEER, 2003; CANTOS *et al.*, 2002; GUSMAN *et al.*, 2001).

Visto que a norbixina pode ser extraída das sementes através de extração alcalina e que a maior busca e produção das sementes tem implicado em especificações mais rigorosas quanto à composição das mesmas, o trabalho teve como objetivo avaliar a obtenção de norbixina por processo físico-químico a partir de extrato de bixina proveniente das sementes de urucum, visando o aumento de corantes de caráter hidrofílico. Bem como, quantificar os teores de carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides, para melhor análise da composição do extrato de sementes de urucum.

Além disso, o trabalho propôs a identificação dos compostos bixina e norbixina utilizando a técnica de espectrometria de massas, seguido de avaliação *in vitro* quanto ao poder antioxidante e antibacteriano dos extratos de sementes de urucum.

Referências

- ATKINSON, G. Saturated fat reduction in biscuits. Reducing Saturated Fats in Foods. **Food Science, Technology and Nutrition**. p. 283-300, 2011.
- BARBOSA FILHO, J. M. Bixa orellana: Retrospectiva de uso populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. Anais do Simpósio Brasileiro de Urucum, João Pessoa, PB, 2006.

- BASTOS, A. R. R.; CARVALHO, J. G. de; ASSIS, R. P. de; CECÍLIO FILHO, A. B. Marcha de absorção de nutrientes em urucum (*Bixa orellana* L.) “tipo cultivado” piave vermelha em fase de viveiro. **Cerne**, v. 5, n. 2, p. 76-85, 1999.
- BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W.C.; MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 902-909, 2003.
- BOUVIER F.; DOGBO, O.; CAMARA B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v.300, n.5628, pp.2089-2091. 2003.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5691-5696, 2002.
- CONSTANT, P.B.L., STRINGUETA, P.C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 20, n. 2, p. 203-220. 2002.
- FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; FILHO, J. C.; NETO, M. B.; SÃO JOSÉ, A. R.; FONTINELLI, I. S. C. Urucuzeiro: Agronegócio de Corantes Naturais. 1º ed., EMEPA, João Pessoa, PB. p. 120, 2002.
- GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reprisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.
- LIMA, L. R. P. ; OLIVEIRA, T. T. I.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGUETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.4, p.196-200, 2001.
- MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. **Ciência Florestal**, v.23, n.2, p.344-362, 2013.
- OLIVEIRA, J.S. Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). 2005. 192 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.

O'SULLIVAN, M. G. Nutritionally Optimized Low Fat Food. A handbook for sensory and consumer driven new product development. **Food Science Technology and Nutrition**. p.177-196, 2017.

RYMBAI, H.; SHARMA, R.R.; MANISH, S. Biocolorants and its implications in health and food industry – a review. **International Journal of PharmTech Research**. v.3, n.4, p. 2228-2244, Oct-Dec 2011.

SILVA, P. M. S.; QUEIROZ, R.S.; ROSSI, T.; ARAUJO, M.C. Corante natural e produção local. 5º Congresso científico têxtil e moda. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Patricia_Silva19/publication/322869525_Corante_natural_e_producao_local/links/5a735f9c458515512077c342/Corante-natural-e-producao-local.pdf>. Acesso em: 25 maio 2018.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Urucum

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.), pertencente à família Bixaceae, é uma planta arbórea, rustica, originária da América Tropical, de origem pré-colombiana, pertence à flora amazônica. Porém pode ser encontrado em locais variados com as mesmas características do clima tropical. Apresenta grande heterogeneidade em suas características botânicas, no entanto, de modo geral, apresenta as seguintes características morfológicas: é considerado um arbusto de crescimento rápido, podendo atingir de 2 a 5 metros de altura, excepcionalmente pode chegar até 10 metros. Possui flores e produzem frutos ovóides, tipo cápsula, chamados de cachopas. No interior das capsulas encontram-se as sementes, estas podem variar de quantidade dentro das cachopas dependendo da variedade da planta (CASTRO *et al.*, 2009, FRANCO *et al.*, 2008) (Figura 1).

Figura 1. Partes da planta de urucuzeiro. (A) Arbusto da planta de urucuzeiro. (B) Floração de urucuzeiro. (C) Frutos e cachopas de urucuzeiro. (D) sementes de urucum. (Adaptado de Franco *et al.*, 2008)

Por ser uma planta de origem tropical é cultivada em diversos países que tem o clima tropical favorável ao seu desenvolvimento. Peru, México, Equador, Indonésia, Índia, Quênia e leste da África são alguns países onde o urucum é cultivado. Destacando-se como grandes produtores Brasil, Peru e Quênia (MANTOVANI *et al.*, 2013).

Antigamente o urucum era tradicionalmente utilizado pelos indígenas como repelente, pintura de corpo em comemorações e protetor de pele e muitas vezes como medicamento para diferentes males. Posteriormente o urucum acabou tornando-se mais popular e começou a ser utilizado como condimento e corante em alimentos, como o colorífico, popular no Brasil (BARBOSA-FILHO, 2006).

O Brasil apresenta a maior diversidade de espécies de urucuzeiro variedades genéticas de urucum, que se diferenciam pelo porte, produtividade, tolerante ou resistente a certas pragas e até mesmo quanto ao teor de bixina. Algumas das variedades são conhecidas com denominações como: focinho de rato, cabeça de moleque, peruana, bico de pato, amarela, Wagner e Piave, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2015).

Em sua composição, as sementes de urucum, apresentam 30% do peso total sendo representado pelos carotenoides. Os 70% restantes estão divididos em cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e umidade (CARVALHO *et al.*, 1991).

As cachopas com sementes são colhidas quando começam a secar, mudando da cor avermelhada para marrom, indicando a maturação. A colheita geralmente realizada manualmente passam por processo de secagem e depois levadas ao beneficiamento. O armazenamento deve ser feito ao abrigo de luz, umidade e presença de insetos, pois estes prejudicam os pigmentos utilizados como matéria prima (FRANCO *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2009).

2.2. Importância econômica

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de urucum (*Bixa orellana* L), apresentando uma produção anual de aproximadamente 12 mil toneladas. O seu cultivo está presente em quase todo o território brasileiro, sendo que, os estados com maior representatividade na produção das sementes são: São Paulo, Rondônia e Pará (IBGE, 2016).

O urucuzeiro possui cultura perene e é considerada de baixo investimento, visto que se desenvolve naturalmente em solos de baixa e média fertilidade natural, em função disso, a produção de urucum era bastante voltada para agricultura familiar ou para pequenos e médios produtores. Porém, com a mudança no cenário comercial onde o urucum tornou-se uma das principais matérias primas para corantes naturais, a sua produção obteve grande crescimento de área e atualmente já se encontram grandes propriedades rurais investindo na cultura. (OLIVEIRA, 2005; FABRI e TERAMOTO, 2015).

No Brasil, a cultura do urucuzeiro e sua produção destinam-se à comercialização dos grãos moídos, em geral aos mercados nordestinos, para a produção de colorífico e corantes naturais, para o sul do país, denominados bixina, norbixina e nobixato. Esses corantes são utilizados por diversas indústrias, tais como laticínios, frigoríficos, massas, doces, sorvetes, óleos e gorduras, bebidas, farmacêutica, têxtil, tintas, desidratados, cosméticos e perfumaria. Atualmente, existem no Brasil várias indústrias produtoras de corantes (SOUSA e FARIA, 2014; BALAN, 2017).

Comercialmente, os fatores que determinam a qualidade das sementes de urucum são: umidade, impurezas, matérias estranhas e teor de pigmento (bixina). Sendo este último considerado o fator mais importante. Visto que o preço da venda das sementes é determinado de acordo com o teor de bixina presente na semente (FRANCO *et al.*, 2002).

Sendo assim, a última década tem sido marcada por um melhoramento genético da espécie, buscando maior produtividade e, principalmente, maior teor de pigmentos. A concentração desses pigmentos, expressos geralmente como bixina, superou a média de 2,5%, podendo atualmente ser encontrada com teores acima de 4-5% (CARVALHO *et al.*, 2010).

Uma vez que a bixina é bastante utilizada como matéria prima corante nas indústrias de panificação, bebidas, condimentos, massas e cosméticos, a produção de urucum apresenta perspectivas promissoras no mercado externo e interno, visto que o mercado de urucum corresponde a aproximadamente 90% do total do consumo de corantes naturais no país e em torno de 70% de corantes naturais no mundo (FABRI e TERAMOTO, 2015).

Além dessa perspectiva promissora no mercado externo, pesquisas tem mostrado como os resíduos, cascas e sementes, que seriam descartados pelas indústrias de corantes após a extração dos pigmentos, possuem rico conteúdo e apontam a funcionalidade da aplicação

desses resíduos, em mistura com rações para alimentação animal ou ainda como adubação orgânica (CASTRO *et al.*, 2009).

2.3. Corantes naturais

A importância da indústria de corantes decorre do fato de que um dos problemas que ocorre com os alimentos é a alteração de sua cor natural após a colheita, no armazenamento e, principalmente, no processamento, quando expostos a altas temperaturas, ou em presença de outros componentes e aditivos que alteram seu nível de acidez. Sendo a cor, principalmente a natural do alimento, um fator fundamental para o marketing do produto, devido ao fato de que consumidor utiliza essa percepção sensorial em primeiro lugar, frente a um novo produto e, em consequência, o uso de corantes tem sido crescente na indústria de alimentos (DOWNHAM e COLLINS, 2000).

Segundo a legislação brasileira os aditivos corantes podem ser classificados como: natural, sintético, sintético idêntico ao natural e inorgânico (MAPA, 2018). Embora seja permitido, e muitas indústrias ainda façam uso de corantes sintéticos, leis nacionais e internacionais vêm restringindo o uso de corantes sintéticos. Além da legislação, o uso de corantes naturais, bem como a substituição de aditivos sintéticos por naturais, tem sido estimulado pela busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis e naturais e a conscientização ambiental da população mundial, forçando uma mobilização das indústrias por novas alternativas (AGNER *et al.*, 2004).

Com a necessidade de substituir corantes sintéticos, a indústria recorre aos pigmentos naturais. Como o corante natural de urucum, que é um entre os poucos aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pois além de não ser tóxico, não alteram o valor nutricional do alimento. Além disso, corantes naturais apresentam baixa toxicidade e baixo custo de produção, tornando a substituição muito conveniente e atrativa (BASTOS *et al.*, 1999).

O poder corante do urucum é proveniente da presença de seus carotenoides, bixina e norbixina. A partir deles são obtidos pigmentos com grande variedade de tons, que vão do amarelo-laranja ao vermelho. O mesmo tem se destacado como o corante natural mais utilizado pelas indústrias de alimentos de todo o mundo, representando por volta de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo (SCOTTER, 2009).

A bixina (Figura. 2(a)) é um carotenoide que possui cadeia com 25 carbonos, contendo um grupo metil éster ao final desta cadeia, e por ter menos de 40 átomos de carbono é definida como apocarotenoide. Somente encontrada em sementes de urucum, representa 80% do total de carotenoides da semente (MERCADANTE e PFANDER, 2001). A presença do grupo metil éster confere característica lipossolúvel a molécula, sendo principal componente das preparações lipossolúveis de corantes naturais. É utilizada em laticínios, margarinas, queijos, manteigas e outros produtos oleosos.

A norbixina (trans e cis; Figura. 2(b) e 2(c)), também considerado um apocarotenoide, possui cadeia carbônica contendo 24 carbonos com terminação de um grupo carboxílico ao final da cadeia carbônica. Encontrado em pequenas quantidades na semente de urucum, é formado através da hidrólise do éster da bixina, conferindo propriedade hidrofílica. Sendo assim é carotenoide principal das preparações hidrossolúveis de corantes naturais, sendo utilizado na fabricação de iogurtes, cervejas, refrigerantes e sorvetes (HAGIWARA *et al.*, 2003).

Figura 2. Estruturas químicas da (a) bixina, (b) trans-norbixina e (c) cis-norbixina extraídas de sementes de urucum.

2.4. Outros compostos

Além da presença dos carotenoides, responsáveis pela importância comercial das sementes de urucum, essa planta tem sido objeto de diferentes estudos na última década devido aos seus benefícios para a saúde humana e suas propriedades bioativas (SELVI *et al.*, 2011; GIORGI *et al.*, 2013; VILAR *et al.*, 2014).

A proteção contra radiação UV é alguns dos temas estudados sobre as diversas propriedades do urucum, visto que é possível sua utilização até mesmo como protetor ultravioleta em fibras naturais, como no caso de tecidos (LUCARINI *et al.*, 2017).

Em razão da presença dos carotenoides nas sementes de urucum, além de ser utilizado como corantes alimentícios e em condimentos, os pigmentos provenientes desses carotenoides tem demonstrado a capacidade de atuarem também como antioxidantes, indicando uma alternativa para a substituição de mais uma classe de aditivos sintéticos, os antioxidantes sintéticos. No entanto, a utilização desses em alimentos ainda não totalmente regulamentada, devido a escassez de trabalhos (GARCIA *et. al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2014).

Referências

- AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687-1693, 2004.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 551-562, 2004.
- BALAN, D.S.L. 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**, v.4, n.7, p. 151-157. 2017.
- BARBOSA FILHO, J. M. Bixa orellana: Retrospectiva de uso populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. Anais do Simpósio Brasileiro de Urucum, João Pessoa, PB, 2006.

- CARVALHO, P.R.N.; CARVALHO, C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B. Estudo da composição de sementes, cachopas, folhas e galhos do urucueiro. In: Seminário Internacional De Corantes Naturais Para Alimento, n.2, 1991, Campinas. ITAL, 317 p.
- CARVALHO, P.R.N.; SILVA, M.G.; FABRI, E.G.; TAVARES, P.E.R.; MARTINS, A.L.M.; SPATTI, L.R. Concentração de bixina e lipídeos em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônômico (IAC). **Bragantia**, IAC, v.69, n.3, pp. 519-524, 2010.
- CASTRO, C.B., MARTINS, C. da S., FALESI, I.C.; NAZARÉ, R.F.R. de; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; VENTURIERI, M.M. **Coleção Plantar: A cultura do urucum**. 2.ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 2009. 61 p.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**. v.35, n.1, p. 5-22. 2000.
- FABRI, E.G.; TERAMOTO, J.R.S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, v. 33, n. 1, p. 140, Mar. 2015.
- FERREIRA, R.L; NOVEMBRE, A.D.L.C. Teste de germinação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Multi Science Journal**, v. 1, n.3, p.46-52. 2015.
- FRANCO, C.F.O.; FABRI, E.G.; BARREIRO, M.; MANFIOLI, M.H.; HARDER, M.N.C.; RUCKER, N.G.A. Urucum: sistemas de produção para o brasil. João Pessoa, Paraíba. EMEPA. 2002.
- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P. da; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro.2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm>. Acesso em: 03/10/2017
- GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p. 1510-1517, ago. 2012.

- GIORGI, A.; MARINIS, P.; GRANELLI, G.; CHIESA, L.M.; PANSERI, S. Secondary metabolite profile, antioxidante capacity and mosquito repelente activity of *Bixa orellana* from Brazilian amazon region. **Journal of Chemistry**. v.3, pp. 1-10, 2013.
- HAGIWARA, A; IMAI, N.; ICHIHARA, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague– Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1157-1164, 2003.
- IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Acessado em 02/10/2017.
- LUCARINI, A.C; TABU, A.S.F.Z.; SILVA, F.F.R.; MORAES, G.A.; PIAZON, G.I.; ZURAWSKI, M.P. Estudo da extração de corante natural que confere proteção ultravioleta em fibras naturais. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.3, n.2, p. 82-94. 2017.
- MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. **Ciência Florestal**, v. 23, n.2, p.344-362, 2013.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenoide minoritário de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.2, p. 193-196, 2001.
- MOREIRA, V.S.; REBOUÇAS, T.N.; MORAES, M.O.B.; JOSÉ, A.R.S.; SILVA, M.V. Atividade antioxidante de urucum (*Bixa orellana* L.) in natura e encapsulado. **Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha**, v. 15, n.2, p. 201-209. 2014.
- OLIVEIRA, J.S. Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). 2005. 192 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.
- SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.26, n.8, p.1123-1145. 2009.

- SELVI, A. T.; DINESH, M. G.; SATYANET, R. S. ; CHANDRASEKARAN, B.; ROSE, C. Leaf and seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v.1, n. 9, pp. 116–120, 2011.
- SOUSA, E.M.P.; FARIA, L.J.G. Extração e estabilidade do corante urucum (*Bixa orellana* L.) em base cosmética. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.16, n.2, p.195-204, 2014.
- VILAR, D.A.; VILAR, M.S.A.; MOURA, T.S.A.L.; RAFFIN, F.N.; OLIVEIRA, M.R.; FRANCO, C.F.O.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, pp.1-11, 2014.

3. PERFIL QUÍMICO POR HPLC-PDA E ESI-ORBITRAP E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Resumo

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta nativa de grande importância econômica no Brasil. Sua extensa produção objetiva a extração de seus pigmentos de poder colorante que são amplamente utilizados como pigmentos naturais na indústria alimentícia, cosmética, como condimentos e na medicina popular. Para fornecer evidência experimental sobre a propriedade antioxidante e conteúdo de compostos bioativos, 23 amostras de sementes de urucum de diferentes localidades produtoras do oeste do estado de São Paulo, Brasil, foram analisadas quanto aos seus conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e bixina e avaliadas frente a dois testes de atividade antioxidante (TAC e DPPH[•]). Observou-se grande variabilidade nos conteúdos de compostos fenólicos nas amostras de sementes de urucum e não foi constatada nenhuma correlação positiva entre alto conteúdo de compostos bioativos, atividade antioxidante e a localidade origem da semente. Independente da região produtora os teores de compostos bioativos foram diferentes, bem como, as atividades antioxidantes *in vitro*. A atividade antioxidante dos extratos acetônicos de urucum foi diretamente associada ao maior conteúdo de compostos fenólicos, seja flavonoides ou carotenoides, dentre eles a bixina, a qual está presente em todas as amostras estudadas pela identificação em ESI-MS.

Palavras-chave: Fenólicos; Antioxidante; ESI-MS

Abstract

Annatto (*Bixa orellana* L.) is a native plant of great economic importance to Brazil. Its nationwide production aims the extraction of its coloring compounds which are widely used as a natural coloring in the food industry, in spices, in cosmetics and in popular medicine. To provide experimental evidence of annatto seeds' antioxidant properties and its bioactive compounds, 23 samples of annatto seeds from different producers from the west of São Paulo state, in Brazil, were analyzed to measure the content of phenolic compounds, flavonoids, carotenoids and bixin and evaluated by two antioxidant activities test (TAC and DPPH[•]). The content of phenolic compounds of the samples varied but there and no positive correlation between the high content of bioactive compounds, antioxidant activity and the seeds' origin site. Independent of the site of production, the content of bioactive compounds were different as well as the *in vitro* antioxidant activities. The antioxidant activity of extracts of annatto was directly associated with increased content of phenolic compounds, either flavonoids or carotenoids, including the bixin, which was present in all samples analyzed by ESI-MS identification.

Keywords: Phenolic; Antioxidant; ESI-MS

3.1. Introdução

Atualmente no Brasil há uma extensa produção de urucum, objetivando a extração de seus pigmentos com poder colorante, devido à presença de carotenoides nas sementes. Estes são destinados para as indústrias tanto de alimentos como de cosméticos, têxtil e também destinado á fabricação de condimentos utilizados na culinária domestica e na medicina popular (SANTOS *et al.*, 2018).

Apesar dos carotenoides encontrados nessas sementes representarem a importância econômica dessa planta, outros compostos também estão presentes na planta, tanto na parte foliar quanto na s próprias sementes juntamente com os carotenoides (VILAR *et al.*, 2014).

Nas sementes outros compostos que podem ser encontrados são compostos fenólicos e geranilgeraniol (CHISTÉ *et al.*, 2011; STRINGHETA e SILVA, 2008). Os compostos fenólicos são considerados importantes para a saúde humana por estarem relacionados com algumas funções biológicas, como por exemplo, a diminuição do risco de doenças inflamatórias, degenerativas e cardiovasculares (KRINSKY, 1994).

A presença desses compostos nas sementes pode variar. Estudos indicam que isso pode ocorrer devido a variedade, condições de clima, plantio e colheita. A região produtora do oeste paulista é umas das principais fornecedoras de matéria prima para as indústrias de corantes naturais localizadas no polo industrial do estado de São Paulo (FABRI e TERRAMOTO, 2015).

Para fornecer evidencia experimental sobre a propriedade antioxidante e conteúdo de compostos bioativos, este estudo propôs caracterizar sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) de áreas comerciais de produção na região oeste paulista quanto às concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides, avaliando o potencial de atividade antioxidantes *in vitro* de extratos de urucum e determinação do carotenoide bixina utilizando cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC-PDA) e espectrometria de massas (ESI-Orbitrap).

3.2. Desenvolvimento

3.2.1. Revisão Bibliográfica

O urucum ganhou destaque com o aumento da demanda das indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e têxteis por corantes naturais. Dentre os compostos colorantes extraídos a partir das sementes de urucum se destacam a bixina e norbixina (BOUVIER *et al.*, 2003; BARBOSA-FILHO, 2006).

Além dos carotenoides, que apresentam importância comercial, as sementes de urucum apresentam em média 3,5% de outros compostos (OLIVEIRA, 2005), destacando-se compostos fenólicos os quais, juntamente com os carotenoides, são considerados benéficos à saúde humana, como mostram estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro*, tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (BEER, 2003; CANTOS *et al.*, 2002; GUSMAN *et al.*, 2001).

Embora, segundo Kovary *et al.* (2001) destaque que a maioria dos estudos sobre urucum foque em protocolos de extração ou na determinação de urucum em alimentos e determinação de carotenoides nas sementes, para Kiokias e Gordon (2003) a ação antioxidante de urucum também representa grande interesse no uso das sementes.

Relatos científicos têm descrito a capacidade antioxidante de carotenoides extraídos de sementes de urucum (SANTANA *et al.*, 2013; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2012; WINKLER-MOSER *et al.*, 2018; MARTINEZ-TOMÉ *et al.*, 2001; CUONG e CHIN, 2016; MELEIRO *et al.*, 2016) e antimicrobiana (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2012; CUONG e CHIN, 2016). No entanto, a capacidade antioxidante pode ser também associada ao conteúdo desses compostos fenólicos.

Franco *et al.* (2008) e Oliveira (2005) relataram que os níveis de carotenoides e fenólicos presentes em sementes de urucum podem variar de acordo com a cultivar, estágio de maturação da semente e região produtora (como efeito do tipo de solo e clima). De acordo com Rebouças e São José (1996) citados em Dias *et al.* (2017), cultivares de urucum apresentam variações associadas às características agrônômicas (forma, cor e tamanho da cápsula, número de cachos por planta, número de cápsulas por cacho e número de sementes por cápsula).

Para a extração desses compostos existem métodos variados. O mais utilizado é a extração com solventes, tais como acetato de etila, etanol, clorofórmio e acetona, para se obter produtos com uma pureza mais elevada (RIOS e MERCADANTE, 2004).

Dependendo do solvente utilizado a extração pode ser mais ou menos seletiva dependendo do objetivo da extração. Segundo Rahmalia *et al.* (2015) a acetona é um bom solvente para a extração da bixina das sementes de urucum. Além disso, em seu estudo utilizando extratos de urucum, os extratos obtidos a partir de solvente acetona apresentaram melhores resoluções para análise em espectrofotômetro UV-Vis.

O método espectrofotométrico pra determinar o conteúdo de carotenoides e outros compostos, como os compostos fenólicos é o mais utilizado desde antigamente, com isso é comum à leitura de extratos de urucum em espectrofotômetro para determinar o conteúdo total de carotenoides presente nas sementes. No entanto, com o avanço da tecnologia, atualmente a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é recomendada para análise de carotenoides e compostos fenólicos com maior precisão, possibilitando a separação e quantificação dos diferentes carotenoides e compostos fenólicos presentes na sementes de urucum (CHISTÉ, *et al.*, 2011).

3.2.2. Material e Métodos

3.2.2.1. Coleta das sementes de urucum

Vinte e três amostras de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) foram adquiridas de centros produtores da região oeste do estado de São Paulo (Figura 3). A coleta das amostras foi feita pela empresa parceira no projeto FAPESP # 2014/50422-1. As amostras foram separadas de acordo com o produtor perfazendo 23 produtores diferentes daquela região. As sementes foram coletadas de cinco diferentes municípios, sendo: Monte Castelo (latitude 21°17'58"S, longitude 51°34'07"W, altitude 375 m; Figura 3a), Tupi Paulista (latitude 21°22'52"S, longitude 51°34'14"W, altitude 400 m; Figura 3b), Uirapuru (latitude 21°34'15"S, longitude 51°20'42"W, altitude 436 m; Figura 3c), Ouro Verde (latitude 21°29'22"S, longitude 51°42'01"W, altitude 350 m; Figura 3d) e Junqueirópolis (latitude 21°30'53"S, longitude 51°26'01"W, altitude 421 m; Figura 3e).

Figura 3. Distribuição geográfica de área cultivada de urucum (*Bixa orellana* L.) na região oeste do estado de São Paulo, Brasil (Adaptado de CATI, 2018).

As variedades de urucuzeiro utilizadas neste estudo são todas *Bixa orellana* L., que pertence à família Bixaceae e cultivar Piave Vermelha, cujas características agronômicas se destacam por sua precocidade em iniciar a produção em 2 anos com máxima produção em 4 anos, cuja produtividade pode alcançar de 300 a 1200 kg ha⁻¹, o que gera um teor de bixina na faixa de 3,5 a 5,0%.

3.2.2.2.Extração de compostos bioativos das sementes de urucum

As sementes de urucum foram submetidas à extração de compostos potencialmente ativos. Para isso, 1 g das sementes foi pesado e submetido à trituração manual em gral e pistilo. Após obtenção de pó fino das sementes, 50 mL de acetona (grau analítico) foram adicionados sob agitação rotativa constante a 100 rpm por 30 min. Após filtração em manta de lã de vidro, os extratos de coloração avermelhada intensa foram acondicionados em frascos de polipropileno ao abrigo da luz e à -18°C até a realização das análises quantitativas (fenólicos, flavonoides e carotenoides) e da capacidade antioxidante (TAC: complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico e do sequestro do radical DPPH[•]).

3.2.2.3. Análise de fenólicos totais pelo método do Folin-Ciocalteu

Os teores de fenólicos totais (JULKUNEN-TIITTO, 1985) foram determinados a partir de mistura de 1 mL do extrato de urucum (após diluição de 50 $\times$) e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v), mantida à temperatura ambiente. Após 30 min 2,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v) foi adicionado para interromper a reação. As misturas foram homogeneizadas e os comprimentos de onda lidos em uma cubeta de quartzo de 1 cm e a 725 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu). Os teores de fenólicos totais foram expressos contracurva de calibração de ácido tânico a uma concentração máxima de 0,1 mg mL⁻¹. A partir da curva de calibração, obteve-se uma equação de reta, a qual foi utilizada para o cálculo das concentrações do conteúdo de fenólicos presentes na amostra. O conteúdo total de fenólicos foi expresso em mg equivalente de ácido tânico por 100 mL de extrato (mg100 mL⁻¹). Foram realizadas três repetições, para a determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de urucum.

3.2.2.4. Análise de flavonoides totais pelo método de complexação com alumínio

Os teores de flavonoides totais (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) foram determinados a partir de uma mistura de 0,5 mL do extrato de urucum (após diluição de 100 $\times$), 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 0,1 mL de AlCl₃ 2% (m/v), 0,1 mL de C₂H₃NaO₂ 1 M. As misturas foram homogeneizadas e mantidas em repouso à temperatura ambiente por 40 min. Após o tempo de reação foram aferidas as absorbâncias a 415 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu), com cubeta de quartzo de 1 cm. A curva de calibração foi realizada com solução de rutina (0,05 g rutina em etanol 70% (m/v)) nas concentrações de 0, 10, 15, 20, 30, 40, 45 e 50 μ g mL⁻¹. Foram realizadas três repetições, para a determinação de flavonoides totais dos 23 extratos acetônicos de urucum.

3.2.2.5. Análise espectrofotométrica dos teores de carotenoides totais

O conteúdo total de carotenoides foi determinado de acordo com o método descrito por Rodriguez-Amaya (1999), com adaptações para sementes de urucum. Os extratos de urucum foram diluídos em clorofórmio e a leitura espectrofotométrica das amostras em cubeta de quartzo de 1 cm foi feita a 450 nm. O teor de carotenoides totais nas amostras foi calculado utilizando a Lei de Lambert-Beer (FAO, 2006). Para a determinação de teor de carotenoides totais nas amostras, foram realizadas três repetições.

O teor de carotenoide foi calculado através da Equação abaixo, em valores de $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$.

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}) = \frac{A \cdot \text{volume (mL)} \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{peso da amostra (g)}} \cdot 100$$

Em que: $A_{450\text{nm}}$ = absorvância; volume = volume total do extrato (50 mL); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de extinção molar do β -caroteno em clorofórmio = 3090.

3.2.2.6. Análise de identificação dos carotenoides por ESI Orbitrap

A análise foi realizada utilizando ESI acoplada ao espectrômetro de massas Q-Exactive Orbitrap com transformada de Fourier (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). Foi utilizada uma injeção por infusão direta com metanol e arraste de nitrogênio dos analitos das amostras de urucum. Foram utilizadas as seguintes condições: voltagem do capilar 4,0 kV, temperatura do tube transfer de 280 °C e o potencial da S-Lens de 50%. A calibração externa foi realizada utilizando uma solução contendo bixina ($\geq 90.0\%$ grau HPLC, Sigma-Aldrich, Brasil). Os dados foram adquiridos no modo de varredura em uma faixa de m/z 100-1000. As análises foram realizadas no modo negativo de ionização com um poder de resolução de 140.000 FWHM a m/z 200. Para caracterização foi realizada a fragmentação de alta energia (HCD), com tensão normalizada para 60 eV. A aquisição dos dados e processamento foi realizada através do software Xcalibur. Os espectros de massas foram acumulados em 100 microscans, centrados e alinhados usando o software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific).

3.2.2.7. Análise cromatográfica do perfil de carotenoides por HPLC-PDA

Os extratos de urucum foram evaporados para remoção da acetona e ressuspendidos em metanol e injetados em cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kioto, Japão) equipado com bomba quaternária e detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA). De acordo com Chisté *et al.* (2011), os compostos foram eluídos em coluna C_{18} a 29 °C, em fase móvel água:ácido fórmico (98:2, v/v) (solvente A) e metanol:ácido fórmico (98:2, v/v) (solvente B) a fluxo constante de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. O gradiente de eluição de A em B foi de 70:30 para 40:60 em 15 min; e então de 40:60 para 20:80 em 10 min; e finalizando com 20:80 para 5:95 em 10 min. Esta última foi mantida por mais 10 min para estabilização do sistema cromatográfico. A obtenção dos espectros de absorção foi de 250 a 600 nm, sendo

que a detecção dos fenólicos foi processada a 320 nm e bixina a 459 nm. A quantificação de bixina foi realizada por comparação com padrões externos onde curvas de calibração de bixina ($\geq 90.0\%$ grau HPLC, Sigma-Aldrich, Brasil) foram utilizadas nas concentrações entre 10 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.2.8. Análise espectrofotométrica da absorção máxima em UV-Visível

Os extratos de urucum foram diluídos 30 $\times$ em acetona, anterior à medida da absorbância em espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu) entre 350 e 600 nm. Um diagrama da absorbância versus comprimento de onda foi plotado e seu ponto de máxima absorção determinado e tido como o lambda maximum (λ_m).

3.2.2.9. Determinação da atividade antioxidante in vitro

3.2.2.9.1. Atividade antioxidante pelo método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (TAC)

Para determinação da capacidade antioxidante total dos extratos de urucum foi utilizado o método de complexação pelo fosfomolibdênio (PRIETO *et al.*, 1999; FERRARI, 2002). Aliquotas de 0,1 mL dos extratos foi adicionado a 1 mL de uma mistura reativa compreendida de ácido sulfúrico 3 M, fosfato monobásico de sódio a 0,1 M e molibdato de amônio a 30 mM. Os tubos, hermeticamente fechados, foram aquecidos a 95°C por 90 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 695 nm, contra tubo controle (0,1 mL de água ultra pura acrescido de 1 mL da mistura reativa). A curva de calibração foi elaborada com ácido ascórbico (grau analítico) nas concentrações de 10 a 200 μM e a capacidade antioxidante total dos extratos foram expressos em equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{mol ácido ascórbico mL}^{-1}$).

3.2.2.9.2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH $^{\bullet}$)

A atividade antioxidante dos extratos de urucum também foi avaliada por meio da capacidade de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $^{\bullet}$), utilizando a metodologia descrita por Ruffino (2007), com algumas modificações. As leituras foram realizadas a 515 nm em espectrofotômetro (UV Mini-1240, Shimadzu). A técnica consistiu na incubação, por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, de 300 μL de uma

solução etanólica de DPPH• a 0,5 mM com 500 µL do extrato de urucum e 3 mL de etanol a 95% (v/v). Em seguida, foi preparada uma solução “controle”, porém substituindo 500 µL da amostra por 500 µL de etanol. Para a solução denominada “branco” será utilizado etanol. O percentual de captação do radical DPPH• foi calculado em termos da porcentagem e expresso atividade antioxidante (AA%), conforme Equação abaixo:

$$AA\% = 100 - \{[(A_{517}^{\text{amostra}} - A_{517}^{\text{branco}}) \times 100] / A_{517}^{\text{controle}}\}$$

Em que: AA% = Porcentagem da atividade antioxidante da amostra; A_{517}^{amostra} = Valor da absorbância do extrato; A_{517}^{branco} = Valor da absorbância do solvente (branco); $A_{517}^{\text{controle}}$ = Valor da absorbância do solvente com adição da solução do radical DPPH (controle).

3.2.2.10. Análise estatística

Os resultados da caracterização da amostra foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram diferenciadas pelo teste Tukey a 95% de confiança através do software Assistat. Enquanto que o perfil do espectro UV-Visível foi utilizado para a análise de *cluster* que agrupou as amostras em diferentes grupos através do *software* Jmp SAS trial version. Foi utilizado o método de Ward para construção do dendrograma, sendo que segundo Hair *et al* (2005) a metodologia consiste em um procedimento de agrupamento hierárquico que utiliza uma medida de similaridade para juntar os agrupamentos e assim a minimizar a variação interna nos grupos.

3.2.3. Resultados e Discussão

Os compostos fenólicos são considerados importantes bioativos, entre outras funções, estão relacionados principalmente à atividade antioxidante em plantas (ROCHA *et al.*, 2011). Nas 23 (vinte e três) amostras de sementes de urucum analisadas, para todos os parâmetros analisados as amostras diferiram significativamente entre si.

O conteúdo total de fenólicos das amostras analisadas variou entre 1,00–2,55 g por 100 g de sementes (b.u.). As amostras #3 ($2,55 \pm 0,03$ g 100g⁻¹), #7 ($2,05 \pm 0,03$ g 100g⁻¹) e #8 ($2,35 \pm 0,00$ g 100g⁻¹) apresentaram estatisticamente os teores mais elevados de fenólicos totais dentre as sementes de urucum (Tabela 1).

As concentrações de flavonoides totais variaram entre 14,30 a 41,40 g por 100 g de sementes de urucum. As amostras que apresentaram maiores teores foram as de numero #11 e #14, com teores equivalentes a $41,40 \pm 0,07$ e $37,62 \pm 0,06$ g por 100 g, respectivamente.

Tabela 1. Caracterização de sementes de urucum quanto aos teores de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides totais e atividades antioxidantes *in vitro*, expressos como a média±desvio padrão.

Amostra #	Localidade de coleta	Fenólicos (g 100g ⁻¹)	Flavonoides (g 100g ⁻¹)	Carotenoides (mg 100g ⁻¹)	Bixina (mg mL ⁻¹)	DPPH*(%)	TAC (%)
1	Monte Castelo	1,45±0,01 ^{efg}	14,41±0,18 ^{fg}	139,59±0,02 ^{ab}	1145,9±0,1 ^{bc}	61±0,11 ^{defg}	39±0,03 ^h
2	Tupi Paulista	1,70±0,01 ^{def}	14,36±0,05 ^{fg}	120,44±0,05 ^{bcd}	1053,1±0,2 ^{de}	54±0,15 ^{efghij}	38±0,00 ^h
3	Tupi Paulista	2,55±0,03 ^a	13,27±0,03 ^g	119,96±0,03 ^{cdef}	1251,1±0,2 ^{ab}	71±0,43 ^{bc}	38±0,01 ^h
4	Monte Castelo	1,35±0,01 ^{fgh}	15,88±0,06 ^{fg}	108,40±0,04 ^{def}	756,0±0,1 ^{fgh}	61±0,15 ^{def}	40±0,01 ^{gh}
5	Uirapuru	1,75±0,01 ^d	15,01±0,07 ^{fg}	112,06±0,03 ^{cdef}	808,0±1,1 ^{fg}	74±0,23 ^{ab}	86±0,02 ^{abc}
6	Monte Castelo	1,55±0,01 ^{defg}	15,50±0,20 ^{fg}	94,07±0,00 ^{fgh}	635,1±0,1 ^{hi}	63±0,77 ^{cde}	87±0,04 ^{ab}
7	Monte Castelo	2,05±0,02 ^{ab}	15,55±0,06 ^{fg}	83,63±0,02 ^{gh}	747,7±0,1 ^{gh}	59±0,15 ^{fghi}	77±0,02 ^{bcd}
8	Ouro Verde	2,35±0,00 ^a	18,92±0,08 ^{de}	109,05±0,03 ^{def}	1041,3±3,9 ^{de}	69±0,23 ^{bcd}	98±0,03 ^a
9	Monte Castelo	1,80±0,02 ^{defg}	16,37±0,14 ^{ef}	122,43±0,00 ^{bcd}	1203,8±0,3 ^{abc}	71±0,10 ^{bc}	91±0,03 ^a
10	Junqueirópolis	1,90±0,02 ^{de}	15,45±0,08 ^{fg}	115,12±0,07 ^{cdef}	649,0±0,1 ^{hi}	59±0,20 ^{efghi}	68±0,01 ^{de}
11	Ouro Verde	1,75±0,00 ^{defg}	41,40±0,07 ^a	110,28±0,05 ^{def}	1248,5±0,0 ^{ab}	55±0,11 ^{efghij}	72±0,01 ^{cd}
12	Monte Castelo	1,75±0,01 ^{cd}	28,84±0,30 ^c	73,72±0,01 ^h	989,8±0,2 ^{ef}	49±0,14 ^j	43±0,01 ^{fgh}
13	Monte Castelo	1,55±0,01 ^{defg}	28,00±0,34 ^c	80,44±0,09 ^{gh}	916,9±2,9 ^{ef}	52±0,10 ^{hij}	54±0,01 ^{efg}
14	Tupi Paulista	1,65±0,03 ^{defg}	37,62±0,65 ^b	77,26±0,02 ^{gh}	853,5±4,6 ^{fg}	53±0,15 ^{ghij}	56±0,01 ^{ef}
15	Monte Castelo	1,00±0,01 ⁱ	28,35±0,12 ^c	81,56±0,01 ^{gh}	991,4±0,2 ^{ef}	51±0,77 ^{hij}	42±0,00 ^{fgh}
16	Tupi Paulista	1,05±0,00 ^{hi}	30,17±0,10 ^c	107,57±0,01 ^{def}	939,1±3,0 ^{ef}	50±0,60 ^{ij}	46±0,00 ^{fgh}
17	Monte Castelo	1,35±0,01 ^{ghi}	20,39±0,02 ^d	146,97±0,04 ^a	1323,0±0,5 ^a	73±0,11 ^{ab}	51±0,02 ^{fgh}
18	Monte Castelo	2,05±0,01 ^{bc}	20,12±0,12 ^d	133,88±0,03 ^{abc}	975,9±0,6 ^{ef}	82±0,12 ^a	51±0,02 ^{fgh}
19	Monte Castelo	1,45±0,02 ^{fg}	16,97±0,22 ^{ef}	116,24±0,02 ^{cdef}	815,7±0,4 ^{fg}	59±0,05 ^{efgh}	44±0,01 ^{fgh}
20	Tupi Paulista	1,70±0,02 ^{cd}	14,47±0,05 ^{fg}	121,55±0,01 ^{bcd}	1031,9±0,3 ^{de}	61±0,07 ^{defg}	47±0,01 ^{fgh}
21	Junqueirópolis	1,25±0,02 ^{fg}	14,33±0,02 ^{fg}	114,71±0,03 ^{cdef}	921,8±0,6 ^{ef}	58±0,14 ^{efghi}	41±0,04 ^{gh}
22	Monte Castelo	1,25±0,00 ^{ghi}	15,23±0,16 ^{fg}	112,23±0,01 ^{cdef}	1021,2±0,6 ^{def}	54±0,15 ^{efghij}	41±0,01 ^{fgh}
23	Monte Castelo	1,60±0,00 ^{def}	14,30±0,10 ^{fg}	98,84±0,04 ^{efg}	676,1±1,1 ^{hi}	54±0,15 ^{efghij}	36±0,00 ^h

Médias de n=3 ± desvio padrão

Letras iguais na vertical indicam não haver diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Cardarelli *et al.* (2008), também avaliaram o conteúdo de fenólicos totais em sementes de urucum e obtiveram valores de 184 mg (equivalentes em ácido gálico) 100 g^{-1} para os extratos metanólicos, 156,50 mg (equivalentes em ácido gálico) 100 g^{-1} para extratos obtidos com solução hidroetanólica (50:50, v v⁻¹) e 109,8 mg (equivalente em ácido gálico) 100 g^{-1} para a extração com etanol.

De modo geral, os valores obtidos para o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foram variados, diferindo estatisticamente uma amostra da outra, salvo exceções que apresentaram valores que não diferenciam estatisticamente.

Park *et al.* (2002), Franco *et al.* (2008), Melo *et al.* (2006) reportaram que estas variações ocorrem em função de diferentes fatores, como: ecologia da flora, período da coleta das sementes, variedade, estágio de maturação da semente, fatores genéticos, condições climáticas e região produtora.

Cabral *et al.* (2009) também reportaram que os teores de compostos fenólicos podem variar de acordo com o solvente utilizado nos processos de extração dos carotenoides das sementes de urucum. A literatura relata inúmeros trabalhos que utilizam a acetona e metanol como solventes de extração preferencial para a bixina de urucum (DEMCZUK *et al.*, 2010; RIOS e MERCADANTE, 2004; COSTA e CHAVES, 2005; TOCCHINI e MERCADANTE, 2001), essa maior afinidade na extração de carotenoides pode influenciar a extração de outros compostos, como os compostos fenólicos e flavonoides, influenciando diretamente na variação dos valores apresentados.

Em relação ao conteúdo de carotenoides as amostras foram analisadas primeiramente quanto ao conteúdo de carotenoides totais nas sementes de urucum. As amostras estudadas apresentaram concentrações entre $146,97 \pm 0,04$ e $73,72 \pm 0,01\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$. Sendo que de modo geral os valores se diferenciaram estatisticamente entre uma amostra e outra. Deste modo, as amostras que apresentaram maiores valores em relação ao conteúdo total de carotenoides foram as amostras #17 ($146,97 \pm 0,04\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$) e #18 ($133,88 \pm 0,03\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$).

Como a bixina é o principal carotenoide encontrado no urucum, representando mais de 80% dos carotenoides presentes nas sementes, foi analisado utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, quanto ao teor de bixina presente nas amostras de sementes de urucum estudadas. Como observado na Tabela 1, pode-se verificar variação nos teores de bixina entre as 23 amostras de sementes estudadas, diferindo estatisticamente

quando comparadas entre si. As amostras apresentaram valores entre 635,1–1323,0 mg de bixina por mL de extrato. Sendo que as amostras que apresentaram maiores valores para o teor de bixina foram as amostras #3 ($1251,1 \pm 0,2$) #11 ($1248,5$) e #17 ($1323,0 \pm 0,5$). Interessante destacar que a amostra #17 apresentou maiores valores significativos tanto para composição de carotenoides totais quanto para o teor de bixina presente.

Os resultados obtidos no teste de capacidade de sequestro de radicais livres DPPH[•] e a atividade antioxidante pelo método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (TAC) são apresentados também na Tabela 1. Observa-se que o percentual antioxidante apresentado em ambas às análises variou entre as amostras analisadas. No entanto, mesmo com a variação entre os valores a resposta ao sequestro de radicais livres mostrou-se positiva.

Sendo assim, na análise utilizando o radical livre DPPH[•], as amostras de extrato acetônico de sementes de urucum de números #5 #17e #18 se destacaram por apresentar os maiores valores significativos de atividade antioxidante, nessas amostras ocorreu o consumo de ($74 \pm 0,23$) ($73 \pm 0,11$) ($82 \pm 0,12$), respectivamente, do radical DPPH[•]. Para o método da complexação do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (TAC) as amostras com valores de atividade antioxidantes que apresentaram maiores valores significativos foram as amostras de numero #6 #8 e #9, que apresentaram ($87\% \pm 0,04$) ($98\% \pm 0,03$) ($91\% \pm 0,03$) de capacidade antioxidante.

Em relação aos diferentes resultados encontrados para a capacidade antioxidante observada neste estudo se deve ao fato das amostras de sementes de urucum originarem extratos com diferentes teores de compostos fenólicos, bem como, de flavonoides e carotenoides (em especial, bixina). Lemos et al. (2011) relataram que a atividade antioxidante satisfatória de extratos etanólicos e hidroetanólicos de urucum foram obtidas com 18,91 a 35,26 %.

Vários estudos têm reportado a relação entre o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides (quercetina, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas), e a atividade antioxidante de produtos vegetais (VELIOGLU *et al.*, 1998; KATSUBE *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2008, ARBOS *et al.*, 2013, CABRAL *et al.*, 2009). Além do conteúdo de compostos fenólicos, a atividade antioxidante de extratos vegetais também está fortemente associada à presença de carotenoides (PODSEDEK, 2007).

Estudos reportam que esta relação entre compostos fenólicos e capacidade antioxidante, está associada a vários fatores como a estrutura química e composição dos

fitoquímicos fenólicos bioativos nas sementes, ou ainda, a posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas. Acredita-se que a orto-hidroxilação influencie positivamente a atividade antioxidante de compostos fenólicos (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Cardarelli *et al.* (2008), também avaliaram a atividade antioxidante de extratos de urucum e obtiveram, a partir de solventes com diferentes polaridades, porcentagens de atividade antioxidante de 38% e superiores a 100 %, para os extratos hidroetanólicos, e a 50% para os etanólicos, respectivamente.

Dessa maneira, os resultados positivos observados em relação a fonte de carotenoides e compostos fenólicos associados a boa atividade antioxidante dos extratos de sementes de urucum, indicam que existe um (oportunidade) mercado, para os produtos (extratos) dessa semente serem usados como fonte de antioxidantes naturais. Somado a isso, a aplicabilidade desses extratos com alto poder antioxidante na indústria, principalmente na indústria de alimentos, é bastante relevante, sendo utilizado como antioxidante natural para alimentos, proporcionando uma alternativa ao uso de aditivos sintéticos. Como observado em alguns trabalhos, que avaliaram o efeito do colorífico de urucum, onde substancias naturais como a norbixina atuou como antioxidante, ou substituto de antioxidante e nitrito em produtos cárneos como hambúrgueres, e obtiveram resultados positivos (FREITAS CASTRO, 2008, MERCADANTE *et al.*, 2010, CASSENS, 1995).

Uma vez que as atividades antioxidantes de extratos de urucum estão intimamente associadas às suas composições em fenólicos e carotenoides, a caracterização química dos extratos acetônicos de urucum foi realizada por eluição em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e por espectrometria por eletrospray. Como padrão externo foi utilizado bixina (grau HPLC com pureza superior a 90%). Os cromatogramas das amostras são apresentados na Figura 4. A presença de bixina nos extratos foi identificada por ESI-MS e produziu o íon $[M-H]^-$ em *full scan MS* com $m/z = 393$. Em todos os espectros, o pico molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 393$ foi dominante; muito embora, o fragmento de íon $[M-H-CH_3OH]^-$ com $m/z = 361$; $[M-H-COO^\bullet]^-$ com $m/z = 349$ e $[M-H-CH_3OH+COO^\bullet]^-$ com $m/z = 317$ também foram observados. Outros íons fragmento dominantes não puderam ser identificados como $m/z = 281$, $m/z = 255$, and $m/z = 135$. Pela análise em MS não foi possível detectar a presença de norbixina (MW = 380,484) extraída das sementes de urucum. Em alguns casos, o íon com $m/z = 379$ foi detectado, mas em muito

baixa intensidade não sendo possível atribuir a identificação. Em todas as sementes de urucum o pico dominante foi atribuído à bixina.

Figura 4. Cromatograma por HPLC-PDA e espectro UV relativo à bixina em PDA (Rt = 3,89 min) (A) e espectro em ESI-MS (B) de extrato de sementes de urucum em metanol.

Em relação aos espectros de varredura na região UV-visível dos extratos acetônicos de sementes de urucum, feitos na faixa entre 350–600 nm, verificou-se similaridade do pico de absorvância, próximo do comprimento de 455 nm, como pode ser observado na Figura. 5. Pela análise dos espectros observou-se também que há outra região de maior absorção comum a todos os espectros, originando dois picos, um a 455 nm e outro a 489 nm (Figura 5).

Figura 5. Espectros de absorção máxima vs. comprimento de onda dos extratos de sementes de urucum em acetona. Em que, A1 a A23 representam as diferentes amostras de sementes estudadas, sendo A1 a amostra de semente #1 e A23 a amostra de semente #23.

De acordo com a análise do comportamento dos espectros dos extratos é possível observar o efeito hiperocrômico, que é o aumento na intensidade de absorção, entre os espectros referentes a cada amostra. Isto indica que a diferença nos perfis de absorção máxima dos extratos de sementes de urucum está na intensidade de e não exatamente no perfil dos espectros (Figura 6), denotando que há diferença de concentração dos compostos químicos extraídos nos extratos e não propriamente na composição em carotenoides e compostos fenólicos, como já verificado na Tabela 1.

Figura 6. Espectros sobrepostos de absorção máxima na região UV-visível de três grupos característicos de extratos acetônicos de sementes de urucum.

A partir dos espectros de absorção máxima foi realizada a análise de cluster seguido da construção de um dendograma. O método utilizado foi o método de Ward. Segundo Hair *et al.* (2009) esse método consiste em um procedimento de agrupamento hierárquico que utiliza uma medida de similaridade para juntar os agrupamentos, tendendo a minimizar a variação interna nos grupos. Pelo método de Ward, cujo propósito foi aplicá-lo na análise hierárquica de clusters de sementes em cada região produtora de onde foram coletadas as sementes, pode-se destacar que independente da região produtora de sementes de urucum, os espectros de absorção puderam ser agrupados em três grupos distintos. Os três grupos formados são baseados no corte feito na maior distância entre os agrupamentos. Dentro de cada agrupamento temos amostras com características similares e entre os agrupamentos existem características distintas quanto à sua composição química (Figura 7).

Figura 7. Análise de cluster (a) (metodologia de Ward) das amostras de urucum com base nos espectros de absorção máxima na região UV-Visível e dendograma (b) identificando os grupos formados.

No primeiro agrupamento formado, podemos identificar as amostras #1, 2, 3, 4, 7, 13, 21. Através de uma análise descritiva observou-se que a curva formada pela média das amostras citadas acima possuem a menor distribuição de valores de absorbância ao longo dos comprimentos de onda.

O segundo agrupamento é composto pelas amostras #5, 6, 8, 10, 19, 15, 20, 12, 22, 18, 16 e 17. A curva formada pela absorbância média das amostras é intermediária aos outros dois grupos. E o terceiro agrupamento possuem as amostras #9, 11, 14 e 23. Esse grupo se caracteriza pela curva formada com as médias das amostras possuírem a maior distribuição de absorbância ao longo dos comprimentos de onda.

Como observado no dendograma, amostras do mesmo centro produtor pode ser agrupada com amostras de outras regiões, indicando que a diferenciação entre a composição das sementes de urucum não está relacionada com a região produtora.

3.3. Conclusão

Conclui-se que quanto aos seus conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e bixina as sementes de urucum, apresentaram diferença significativa entre elas. Quando avaliadas frente a dois testes de atividade antioxidante (TAC e DPPH[•]), a atividade antioxidante dos extratos acetônicos de urucum se mostrou favorável apresentando resultados positivos. No entanto, não foi possível correlacionar, estatisticamente, a atividade antioxidante com o conteúdo de compostos fenólicos ou a presença de carotenoides, dentre eles a bixina, a qual está presente em todas as amostras estudadas pela identificação em ESI-MS. Independente da região produtora os teores de compostos bioativos foram diferentes, bem como, as atividades antioxidantes *in vitro*. Isto indica que as amostras de sementes de urucum estudadas apresentam diferenças entre elas, mas não estão relacionadas com as regiões produtoras.

Referências

- ARBOS, K.A.; STEVANI, P.C.; CASTANHA, R.F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 161-165, Abril, 2013.
- BARBOSA-FILHO J. M. *Bixa orellana*: Retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano, Simpósio Brasileiro do Urucum—SIMBRAU, João Pessoa, Brasil, 2006.
- BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W.C.; MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 902-909, 2003.
- BOUVIER F., DOGBO O., CAMARA B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**. v.300, n.5628, pp. 2089-2091. 2003.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.B.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32. p.1523-1527, 2009.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5691-5696, 2002.
- CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT – Food Science Technology**, n. 41, p. 1689-1693, 2008.
- CARVALHO, P.R.N.; SILVA, M.G.; MOREIRA, C.G.C. Avaliação dos métodos espectrofotométricos de análise de sementes de urucum. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.2, n.23, p. 181-188, 1993.
- CASSENS, R.G. Use of sodium nitrite in cured meats today. **Food Technology**, v. 52, n.10, p. 54-59, 1995.

- CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MASAHARU, I.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**. v.30, n.7, p.1512-16, 2007.
- CHISTE, R. C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F. C.; MERCADANTE, A. Z. 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**. v.1218, n.1, p.57-63, 2011.
- COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.149-152, 2005.
- CUONG, T.V.; CHIN, K.B. Effects of Annatto (*Bixa orellana* L.) Seeds Powder on Physicochemical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Pork Patties during Refrigerated Storage. **Korean Journal of Food Science**. v.36, n.4, p.76-86, 2016.
- DEMCZUK, J.R.B.; NAKAMURA, A.M.; IZIDORO, D.R.; RIBANI, R.H. Utilização de Análise Multivariada na Caracterização de Farelo de Urucum. In: ICBF 2010/ X Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, Brasil: Anais, 2010.
- DIAS, N.O.; REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R.; AMARAL, C.L.F. Morpho-agronomic characterization and estimates of genetic parameters in annatto plant. **Horticultura Brasileira**, v.35, p. 242-246. 2017.
- FERRARI, C.K.B. Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e colorimetria em 21 alimentos comercializados no município de São Paulo [Tese] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP; 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Combined Compendium of Food Additive Specifications, in: 67th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 3, 11. 2006.
- FRANCO, C. F. O.; FABRI, E. G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M. H.; HARDER, M. N. C.; RUCKER, N. C. A. **Urucum. Sistema de produção no Brasil**. João Pessoa, PB. 2008, 112p.

- FREITAS CASTRO, W. Avaliação do efeito protetor do colorífico como antioxidante natural na oxidação lipídica em carne de frango. 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em ciência de alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v.42, n.8, ago, 2012.
- GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.
- HAIR, J. F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre, Bookman, 2009. 688p.
- JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 213–217, 1985.
- KATSUBE, N.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu Assay. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, n.52, 2004.
- KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, n. 83, p. 523-529, 2003.
- KOVARY, K.; LOURAIN, T.; SILVA, C.; ALBANO, F.; PIRES, M.B.; LAGE, S.L.; Felzenswalb, I. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, n.85, pp. 431-440. 2001.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Applied Chemistry**, n. 66, p. 1003-1010, 1994.
- LEMOS, A.R. Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 62-68, jan. 2011.

- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and Procedures for the Ultraviolet Spectral Analysis of Flavonoids. In: The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 35–40.
- MARTINEZ-TOME, M. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v.64, n.9, p.1412-1419, 2001.
- MELEIRO, V. C.; NASCIMENTO, K. O.; BARBOSA JUNIOR, J. L.; SALDANHA, T.; BARBOSA, M. I. Carotenoids from annatto as potential antioxidants in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) burgers. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, pp. 543-548, 2016.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n.3, pp. 639-44.2006.
- MERCADANTE, A.Z.; CAPITANI, C.D.; DECKER, E.A.; CASTRO, I.A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v.84, p.718-726. 2010.
- OLIVEIRA, J.S. Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). 198p. [Tese doutorado em Engenharia Química], Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**. v. 32, n.6, pp.997-1003. 2002.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetable: a review. *Food Science and Technology*, v. 40, p. 1 -11. 2007.
- PRIETO, P.; PINEDA M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**. v.269, pp. 337-41. 1999;
- RAHMALIA, W.; FABRE, J.F.; MOULOUGUI, Z. Effects of cyclohexane/acetone ratio on bixin extraction yield by accelerated solvent extraction method. **Procedia Chemistry**. v.14, p. 455-464. 2015.

- REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R.. A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização. Vitória da Conquista: UESB. 42p. 1996.
- RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2004.
- ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B. da; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P. da; AGOSTINI-COSTA, T. da S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press, Washington, D.C. 1999.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127, p.1-4, 2007.
- SANTANA, M.C.C.B.; MACHADO, B.A.S.; SILVA, T.N.S.; NUNES, I.L.; DRUZIAN, J.I. Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 544-550, Mar. 2013.
- SANTOS, E.J.; LOURENZANI, W.L.; LOURENZANI, A.E.B.S. Histórico e ascensão do urucumna microrregião de Dracena-São Paulo. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.12, n.1, p.29-39. 2018.
- SHAHIDI, F.; JANITHA P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Food Science Nutrition**. v.32, n.1, pp. 67-103. 1992.
- STRINGHETA, P. C. & SILVA, P. I. Pigmentos de urucum. Extração, Reações Químicas, Usos e Aplicações. Editora Suprema. Viçosa, MG. 166p. 2008.
- TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 310-313, 2001.

- VILAR, D.A.; VILAR, M.S.A.; MOURA, T.S.A.L.; RAFFIN, F.N.; OLIVEIRA, M.R.; FRANCO, C.F.O.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**., v. 2014, pp. 1-11, 2014.
- VIUDA M., Ciro, G.L., Navajas, Y.R. In vitro antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. *Journal of Food Safety*, n. 32, pp. 399–406. 2012.
- WINKLER-MOSER, J.K.. Stability and Antioxidant Activity of Annatto (*Bixa orellana* L.) Tocotrienols During Frying and in Fried Tortilla Chips. *Journal of Food Science*. v.83, n.2, pp. 266-274. 2018.
- VELIOGLU, Y. S.; NAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4113-4117. 1998.

4. CONVERSÃO DE BIXINA EM NORBIXINA COM IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA V-EASI E ANÁLISE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE URUCUM

Resumo

Norbixina, um carotenoide hidrossolúvel, de grande interesse pela indústria alimentícia, dado que ao contrário da bixina, apresenta propriedade como composto colorante solúvel em água, aumentando a aplicação do corante urucum para alguns alimentos que necessitam de corantes com esta propriedade. Portanto, dado menor teor de norbixina, o trabalho objetivou avaliar o aumento no rendimento desse carotenoide a partir de extratos contendo bixina. Para isso, foram testadas condições para reação de saponificação e sua posterior identificação em espectrômetro de massas. Além disso, seguindo a linha de substituição de sintéticos por naturais, optou-se também por avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos a partir dessas sementes, avaliando sua potencial aplicação. Constatou-se que a norbixina pode ser obtida através de extratos de bixina, porém seu maior rendimento ainda depende de ajustes na reação. Em relação, a atividade antimicrobiana foi observada que os extratos testados não apresentaram inibitórios para os microrganismos testados.

Palavras chave: Corantes; Saponificação; Antibacteriana

Abstract

Norbixin, a water-soluble carotenoid, has been increasingly stressed and desired by the food industry as it is a water soluble coloring compound, unlike bixin. Therefore, due to the lower content of norbixin in comparison to bixin, the present study aimed to evaluate the increase in the yield of this carotenoid from extracts containing bixin. Thus, conditions were tested for saponification reaction and its subsequent identification in mass spectrometer. Moreover, due to tendency of substitution of synthetic coloring by natural ones, the antimicrobial potential of extracts obtained from these seeds were evaluated as well as its potential application. It was found that norbixin can be obtained from bixin extracts; however, in order to obtain a higher yield, adjustments to the reaction are necessary. Regarding the antimicrobial activity it was observed that the extracts tested showed no inhibitory power for the tested microorganisms.

Keywords: Dyes; Saponification; Antibacterial

4.1. Introdução

Atualmente, no Brasil, muitas indústrias atuam no comércio de corantes. Do total dessas empresas, aproximadamente 54% produzem corantes naturais e 12% corantes

artificiais. Dentre os naturais, o proveniente de urucum é o mais produzido e utilizado. Sendo assim, nos últimos anos houve uma alta na demanda por corantes naturais e, conseqüentemente, de sementes de urucum, visto que partir dessas sementes é produzido o corante de urucum (DIAS *et al.*, 2017).

A partir das sementes de urucum são extraídos dois principais carotenoides, essenciais para a fabricação de corante de urucum. O principal deles é a bixina, extraída em maior quantidade, representando 80% do total de carotenoides encontrado nas sementes, seguido pelo carotenoide norbixina, que representa aproximadamente 10% dos carotenoides encontrados nas sementes. Ainda, outros carotenoides são encontrados diretamente das sementes, porém, apresentam baixos teores (SATYANARAYANA *et al.*, 2003).

Atualmente a bixina é utilizada em 80% das preparações de corantes naturais, justamente por ser extraída em maior abundância das sementes, sendo o carotenoide com maior importância econômica. Como corante alimentício, é bastante aplicado em laticínios, como queijos, margarina e manteiga. Já a norbixina é bastante empregada no setor de embutidos, a principal utilização é na salsicha, onde se aplica como corante líquido hidrossolúvel. Há ainda usos nas indústrias de sorvetes, confeitaria e massas (LIMA, 2001).

Rios e Mercadante (2004) citam a bixina como carotenoide de maior concentração nas soluções coloríficas lipossolúveis do urucum, enquanto a norbixina é predominante nas preparações hidrossolúveis. Isso se deve as diferenças estruturais das moléculas. Segundo Oliveira (2005) e Lima *et al.*, 2001, a presença do éster metílico na molécula de bixina, confere a ela essa propriedade, enquanto que para a norbixina a hidrossolubilidade é conferida em razão da presença do grupamento carboxila sítio de interações com moléculas de água. Sendo assim, a retirada do grupo metil éster da bixina origina a norbixina, um ácido dicarboxílico.

Em vista da utilidade do carotenoide norbixina, a literatura tem apresentado formas de extração da norbixina diretamente das sementes, visto que em condições alcalinas a bixina, pode sofrer saponificação e produzir norbixina (GARCIA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009; NACHTIGALL *et al.*, 2009). No entanto, os autores encontraram que dependendo das condições não ocorre a formação da norbixina ou até mesmo o sal de norbixina, obtendo-se a saponificação parcial da bixina, ou até mesmo gerando produtos de degradação.

Portanto, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos de uma reação de saponificação a partir da bixina extraída das sementes para a obtenção de norbixina. Dado as dificuldades na comparação entre os resultados do teor de bixina ou carotenoides encontrados nas sementes e urucum, também foi proposto a identificação desses carotenoides por espectrometria de massas. Uma técnica moderna, que pode ser executada com rapidez e com preparo mínimo de amostra, garantindo maior praticidade para análise.

Por fim, seguindo a linha de substituição de sintéticos por naturais, optou-se também por avaliar o potencial antimicrobiano de extratos obtidos a partir dessas sementes, avaliando sua potencial aplicação. Com isso, o presente trabalho além dos outros objetivos citados anteriormente, também propõe analisar/avaliar a atividade antibacteriana de extratos de sementes de urucum (*B. orellana* L.) em acetona originários de diferentes municípios do estado de São Paulo, frente a agentes bacterianos padrões internacionais de interesse em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*.

4.2. Desenvolvimento

4.2.1. Revisão Bibliográfica

4.2.1.1. Corante natural de urucum

Os corantes têm sido largamente utilizados como um meio de melhorar a aparência de alimentos, bebidas e cosméticos. No passado, os corantes artificiais eram os principais agentes de coloração dos produtos industrializados. Nos últimos quinze anos, com base nos resultados de estudos toxicológicos, o uso de inúmeros corantes sintéticos tem sido proibido por legislações de países específicos e associado ao alto consumo de corantes pelas indústrias. Somado a este fato, a tendência mundial pela procura por alimentação mais saudável e balanceada tem resultado na busca pela substituição dos corantes sintéticos pelos naturais (ANGELUCCI, 1989; FABRI e TERAMOTO, 2015).

O corante de urucum é utilizado extensivamente em suas várias formas, na indústria de alimentos, para tonalidades amarelas e vermelhas. Sendo a bixina o carotenoide majoritário presente nas sementes, representando cerca de 80% de todos os carotenoides presente nas sementes, é, portanto o carotenoide mais extraído e utilizado nas preparações de corantes naturais pela indústria (CARVALHO, 2010).

Nas sementes, estão presentes naturalmente outros carotenoides como norbixina, sal da norbixina, que pode ser também considerado produto de degradação, visto que estes carotenoides apresentam alta instabilidade quando expostos a luz, temperatura e oxigênio, além de outros compostos. No entanto estes outros carotenoides e até mesmo os outros componentes da semente, podem ser encontrados em quantidades bastante reduzidas, não apresentando, um valor significativo de rendimento para extração.

Como a biossíntese da bixina sugere, acredita-se que ela provem do carotenoide precursor licopeno (BOUVIER *et al.*, 2003; MERCADANTE *et al.*, 1997), mais especificamente sendo produto da clivagem de carotenos. Essa ruptura é mediada por enzimas que atuam em pontos específicos originando dois novos carotenoides (OLIVEIRA, 2005 (Figura 8)).

Figura 8. Esquema representativo simplificado da biossíntese da bixina.

A estrutura química da bixina se caracteriza por ser um apocarotenoide que apresenta dois grupos carboxílicos, um deles sendo um éster metílico, (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) (Figura 2). A molécula é quimicamente instável quando isolada,

convertendo-se por isomerização em *trans*-bixina. Sua estrutura a torna lipossolúvel, sendo bastante solúvel em gorduras e álcoois, mas insolúvel em água.

A norbixina, também está presente nas sementes de urucum e é um carotenoide dicarboxílico hidrofílico. Por ação de álcalis, o substituinte metílico da bixina é hidrolisado obtendo-se a norbixina, outro carotenoide encontrado em sementes de urucum, apresentando características de hidro solubilidade.

Os pigmentos hidrossolúveis de urucum são utilizados principalmente em queijos, sorvetes, derivados de cereais, confeitos, bebidas, molhos e salsichas, representando quase a totalidade do mercado de urucum. Os pigmentos lipossolúveis são usados em alimentos como margarinas, cremes vegetais, queijos, sorvetes, entre outros produtos (PRENTICE-HERNANDEZ *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 2001).

A importância da norbixina tem ganhado algum destaque. O fato de ser um carotenoide com propriedade hidrossolúvel é uma propriedade desejada pela indústria, com destaque para a indústria de corantes alimentícios e de alimentos.

Segundo Carvalho (1992) e Pimentel (1995), o sal da norbixina pode se obtido através da extração alcalina das sementes de urucum. Sendo a bixina um éster monometílico de um ácido dicarboxílico, o grupo metil pode ser saponificado quando em condições alcalinas, produzindo um ácido dicarboxílico livre de cadeia longa, denominado norbixina. Para aplicações em produtos aquosos a norbixina, que é o derivado desmetilado da bixina, é a forma de pigmento normalmente empregada (COLLINS, 1992; COSTA e CHAVES, 2005).

Ambas, bixina e norbixina podem estar presentes em uma extração, tanto na forma *cis* como na *trans* (PRENTICE-HERNANDEZ *et al.*, 1993; SCOTTER *et al.*, 1998, 2001). A bixina, em condições alcalinas, pode sofrer saponificação e produzir o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina. Em excesso de álcali, o ácido dicarboxílico dissocia-se para formar seu sal, geralmente de potássio ou sódio, solúvel em água (PIMENTEL e STRINGHETA, 1999).

A grande demanda dos extratos de urucum com características de elevada qualidade tem acentuado as deficiências dos processos comumente usados para produzir os corantes, incluindo riscos de degradação térmica dos extratos e de oxidação dos pigmentos. As quantidades relativas de bixina e seus produtos de isomerização e de degradação em

preparações comerciais de urucum variam dentro de amplos limites, dependendo das condições de processamento (PRENTICE-HERNANDEZ *et al.*, 1992).

O extrato de bixina apresenta relativamente um baixo custo de produção e não tem toxicidade quando aplicada em baixas concentrações (JUNIOR *et al.*, 2012), além disso, tem características pouco comuns, tais como a possibilidade de obtenção de extratos solúveis em água e solúveis em óleo a partir da mesma fonte através de uma saponificação, e uma melhor afinidade em sua aplicação devido a sua propriedade de se ligar a certas proteínas presentes nos alimentos (ALVES *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados para avaliar os fatores que influenciam o método de saponificação da bixina, para assim estabelecer os valores de cada parâmetro e desta maneira otimizar a extração, com o fim de aumentar os rendimentos e a pureza do sal de norbixina (RIOS E MERCADANTE, 2004; NACHTIGALL *et al.*, 2009). No entanto esse estudos são feitos a partir da sementes aqui o objetivo é transformar a bixina diretamente)

Em geral, a conversão da bixina em norbixina e seu sal, depende principalmente da concentração da base, ou seja, quanto mais concentrada a base mais completa será a conversão. Um tempo de extração mais prolongado tem efeitos positivos na conversão da bixina em norbixina, porém podem também ocasionar degradação destes compostos. Quando temperaturas mais elevadas são utilizadas, há um aumento no rendimento de extração dos pigmentos, mas é necessário usar soluções alcalinas mais concentradas para não ter deficiências na reação de hidrólise da bixina em norbixina (SILVA *et al.*, 2009).

4.2.1.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental moderna com ampla aplicação dentro das diferentes áreas de conhecimento e pesquisa. Devido ao crescente desenvolvimento de novas técnicas e avanço na própria parte instrumental, a espectrometria de massas atualmente pode ser aplicada nas áreas de química, biologia, ciências médicas e tecnológicas e diferentes áreas da pesquisa (SCHWAB, 2015).

Atualmente, com o surgimento de novas metodologias associadas à espectrometria de massas e diferentes fontes de ionização, houve o surgimento de alta resolução, precisão, sensibilidade e rendimento de diferentes compostos. Permitindo que os mesmos possam ser

analisados por técnicas de ionização branda, com grande rapidez e com preparo mínimo de amostra, o que garante maior praticidade para análise (SCHWAB, 2015).

Para a confirmação da identidade e a elucidação da estrutura de compostos como carotenoides, a espectrometria de massas é uma técnica altamente recomendada, pois quase sempre fornece a massa molecular e alguns dos fragmentos obtidos por impacto de elétrons são indicativos dos grupos terminais (MERCADANTE e RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A literatura confirma que a espectrometria de massas foi largamente utilizada para a elucidação ou confirmação das estruturas de carotenoides em fungos, algas e bactérias. Já a sua utilização para identificação de carotenoides em alimentos é um acontecimento mais recente (MERCADANTE e RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Para análise em espectrômetro de massas existem diversas técnicas de ionização, a Ionização por Eletrospray (ESI), técnica de ionização mais branda, menos agressiva, aplicada especificamente para amostras em solução possui destaque de aplicação. No ESI, a ionização é obtida através da protonação ou desprotonação, as espécies observadas são chamadas de protonadas $[M+H]^+$, desprotonadas $[M-H]^-$. Também há a técnica *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (DESI-MS), proposta para solucionar as desvantagens apresentadas no ESI, como a aplicação somente de amostras em solução (MURGU, 2011).

Em 1994 foi lançada a ionização no campo da espectrometria de massas por Hyrabayashi (HYRABAYASHI *et al.*, 1994). Essa técnica chamada de *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry* (EASI-MS). Nesse modelo, os íons podem ser produzidos utilizando apenas um spray contendo uma solução de metanol acidificada a uma velocidade supersônica (LORDEIRO, 2011).

A EASI é a mais simples, suave e facilmente implementada fonte de ionização, acontece sem a necessidade de aplicação de voltagem, luz UV, laser, descarga corona ou aquecimento. Uma fonte de EASI pode ser construída empregando-se materiais simples, comuns em laboratórios de espectrometria de massas, e instalada em poucos minutos. EASI baseia-se na ionização “*sonic-spray*” (SSI em inglês) que cria microgotas de solvente carregadas devido à distribuição estatística não-balanceada de cátions e ânions. O denso fluxo de microgotas carregadas promove a dessorção do analito da superfície, a ionização e a transferência dos íons para a fase gasosa. Assim na ionização por spray sônico, a composição do solvente no spray, a superfície de ionização, a pressão do gás de nebulização, e a

polaridade do analito são parâmetros importantes no desenvolvimento de um método EASI-MS. Estas variáveis podem afetar a estabilidade do sinal e sua detectabilidade. A composição do solvente no spray representa outro importante parâmetro que deve ser considerado na otimização do método EASI-MS (HADDAD *et. al.*, 2008)

Como a EASI-MS é baseada em SSI, ela se torna a técnica mais suave de ionização em espectrometria de massas ambiente, gerando íons do analito intactos, sem ou com muito pouca dissociação. Esta característica da EASI é útil na análise de moléculas lábeis e misturas complexas, pois para cada molécula é formado apenas um íon no espectro. Uma vez que não se aplica alta voltagem e nem aquecimento no capilar do spray, transformações térmicas ou eletroquímicas que ocorrem em outras técnicas são minimizadas ou eliminadas. Portanto, a EASI se torna uma técnica que não apresenta grandes dificuldades de implementação e operação, sendo uma opção prática para análises em campo (TEGA, 2011)

A técnica ionização por spray sônico ambiente por efeito Venturi (V-EASI) apresenta os mesmos princípios de ionização que a EASI, porém sem necessidade de uma bomba elétrica, porque incorpora um sistema de sucção baseado no efeito Venturi, ou seja, o estreitamento na vazão de um fluido em um sistema fechado provoca o aumento da pressão e velocidade, neste ponto, o fluido é succionado para o sistema quando um tubo é ligado (Figura 9).

Nessa técnica utiliza-se um gás inerte (nitrogênio) que atravessa uma rede de pequenos tubos, com diferentes diâmetros, gerando um vácuo que aspira as moléculas do material a ser avaliado, e, ao mesmo tempo, são devidamente ionizadas para processamento no aparelho que lê as “impressões digitais” que caracterizam cada componente, de acordo com a massa de cada um deles.

Figura 9. Mecanismo funcionamento V-EASI (Fonte: Laboratório ThoMson, 2013)

4.2.1.3. Atividade antibacteriana

A contaminação microbiana em alimentos, atualmente é uma das maiores preocupações das indústrias, em especial a de alimentos, visto que pode acarretar em consequências graves para a mesma. Visando evitar a contaminação ocasionada por microrganismos, as indústrias fazem uso de preservantes químicos sintéticos nos alimentos. Alternativas naturais para substituir esses conservantes sintéticos têm sido testados e implementados pelas indústrias visando reduzir os riscos à saúde e por serem muitas vezes mais viáveis economicamente (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008).

Além disso, o objetivo de se substituir preservantes sintéticos por naturais pode ser relacionado ao crescente problema de resistência bacteriana. Isso porque, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas em produtos, principalmente em cosméticos, agravou essa problemática exigindo o controle do emprego dessas drogas e a pesquisa de novos antimicrobianos, tanto sintéticos como naturais ou a associação de ambos (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Além de a utilização de preservantes naturais pode ser positiva não só em substituir os sintéticos, mas como também conciliar suas diversas propriedades (LIVERMORE.2007).

Vários estudos têm evidenciado os potenciais antioxidantes e antimicrobianos de uma grande variedade de frutas e vegetais. O uso de *B. orellana* L. (urucum) na produção de corantes naturais para alimentos já é bastante disseminado, agora vem ganhando espaço cada vez mais pronunciado em outros aspectos, bem como a sua capacidade antioxidante pela presença dos carotenoides e composto fenólicos (GARCIA *et al.*, 2012).

O óleo essencial das sementes de urucum é rico em geraniolgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além dos carotenoides bixina e norbixina (contendo em menor quantidade alfa e beta-caroteno). O uso de óleo na medicina popular ocorre principalmente para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras, e como afrodisíaco (LORENZI E MATOS, 2008).

Já é conhecida a atividade antimicrobiana do urucum bem como sua relação em agregar qualidade aos alimentos através da conservação adquirida pela capacidade antioxidante (BRAGA *et al.*, 2007; ROJAS *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2005; NALIMOVA *et al.*, 2005). Galindo-Cuspinera e Rankin (2005) demonstraram que as frações obtidas de sementes de urucum foram responsáveis pela propriedade antibacteriana.

4.2.2. Material e métodos

4.2.2.1. Condições reacionais

Em face de aumentar o volume e o rendimento de norbixina, foi realizado um experimento de uma reação de conversão do carotenoide majoritário encontrado nas sementes de urucum (*B. orellana* L.), bixina, para o de menor quantidade norbixina.

Como a bibliografia indica, a norbixina pode ser produzida através da saponificação da bixina (BARETH *et al.*, 2002; KOUL *et al.*, 2003; RIOS e MERCADANTE, 2004; TOCCHINI e MERCADANTE, 2001). Portanto, para isso o experimento, utilizou como referência algumas reações já estudadas anteriormente sobre extração de norbixina de sementes através da adição de base como solvente extrator (NACHTIGALL *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

Para a reação de conversão, tendo como base os estudos citados, foi utilizado o extrato acetônico de sementes de urucum (obtidos através da metodologia descrita anteriormente no item 3.2.2.2 deste trabalho) com adição de uma base, com temperatura controlada por 1 hora de reação. Foram utilizadas técnicas de espectrofotometria UV-visível e espectrometria de massas V-EASI, respectivamente, para o monitoramento da reação e para a identificação dos compostos formados a partir da reação.

Inicialmente, foram realizados ensaios com hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) para a escolha da base a ser utilizada na reação, avaliando qual apresentaria o melhor desempenho na conversão, para ambos a concentração foi de 0,5 mol L⁻¹ em temperatura de 30°C.

Em seguida, foi fixado a utilização do hidróxido de potássio (KOH) e foi avaliado em qual das seguintes concentrações pré-determinadas (0,25, 0,5 e 0,75 mol L⁻¹) teriam melhor desempenho durante a reação. A avaliação no desempenho das concentrações utilizada foi comparada com uma solução controle que continha apenas água destilada em seu meio.

Encontrado qual a base e em qual concentração seguiria o ensaio, foi fixado a base hidróxido de sódio (KOH) de concentração 0,5 mol L⁻¹ e avaliou-se em qual das temperaturas pré-estabelecidas (30 e 70°C) haveria o melhor desempenho na reação.

Para o monitoramento, durante a reação, utilizou-se um sistema FIA (*Flow Injection Analysis*), onde a solução contendo extrato acetônico de sementes de urucum com alto teor de

bixina, somado a base extratora, rodavam em ciclo fechado com passagem por uma cubeta de quartzo acoplado ao espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu Co.). O espectrofotômetro foi utilizado no modo Kinetcs a 470nm, onde eram feitas leituras a cada minuto.

Após a determinação das condições ótimas e execução da conversão no FIA, foi realizada a identificação de compostos no início, durante e após a reação, por meio de alíquotas que foram coletadas a cada 20 minutos para análise em espectrômetro de massas.

4.2.2.2. Análise de identificação por V-EASI-LCMS

A análise foi realizada utilizando V-EASI acoplada ao espectrômetro de massas com analisador monoquadrupolo LCMS 2010 (Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma injeção por infusão direta com metanol e vazão de gás de nebulização de 5 L/min. As análises foram realizadas no modo negativo de ionização. A detecção foi realizada por monitoramento de íons selecionado (modo *SIM*, do inglês “*selected ion monitoring*”), na faixa de m/z 100-500.

4.2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.2.3.1. Método de Difusão em Ágar

A atividade antimicrobiana do extrato acetônico de sementes de urucum foi realizada pelo método de difusão em ágar ou teste de difusão em disco, conforme os procedimentos descritos pelo *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953).

Para esse método de difusão em ágar, foi testado a sensibilidade do microrganismo ao agente inibitório, no caso, o extrato de urucum. Caso a amostra apresente ação inibitória sobre os patógenos, um halo de não crescimento ao redor do disco seria formado, havendo no restante do meio o crescimento das colônias.

4.2.2.3.2. *Preparo da amostra*

Os extratos utilizados para análise antimicrobiana foram obtidos através da metodologia descrita no item 3.2.2.2 do trabalho. A concentração utilizada do extrato foi de 20 mg/mL.

4.2.2.3.3. *Preparo do inoculo*

Colônias de bactérias repicadas 48h antes do teste foram diluídas em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (NaCl 0,85%). O parâmetro de turbidez foi comparado ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, preparado segundo o manual (NCCLS, 2003). Utilizando um espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo (UV Mini-1240) a 650 nm. A concentração microbiana foi ajustada de forma que as absorbâncias das suspensões bacterianas apresentassem o mesmo valor do tubo 0,5, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.2.2.3.4. *Preparo do teste*

Para o teste foram utilizados discos de papel estéreis contendo 20 µL com os extratos acetônicos de urucum. Em seguida, foram colocados em estufa a 35 °C por 24 horas para evaporação total do solvente. Para controle negativo, foram preparados discos de papel impregnados com acetona (solvente utilizado no extrato) e, para o controle positivo, foram usados discos com 10 µL de solução antibiótica de azitromicina (com concentração de 131,5 mg/ml ou 0,13 g/ml).

Nas placas contendo meio PCA (Plate Count Agar), que após o preparo, foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos e deixado resfriar até 50 °C, foi feita a suspensão dos microrganismos com auxílio de swab estéril. Em seguida, cinco discos de papel foram distribuídos em cada placa foram distribuídos três discos contendo o extrato, um disco como controle negativo de solvente acetona e um disco como controle positivo contendo antibiótico azitromicina. O teste foi feito em triplicatas. Após 18 h de incubação a 35 °C foi medido o diâmetro dos halos de inibição de crescimento nas placas.

4.2.3. Resultados e discussão

4.2.3.1. Efeito de condições reacionais sobre a redução na absorbância referente à bixina

Sendo a bixina um éster monometílico de um ácido dicarboxílico, quando em condições alcalinas o grupo metil pode ser saponificado dando origem a novos compostos principalmente a norbixina (COLLINS, 1992; PIMENTEL, 1995).

Já é conhecido que o uso de base adicionada a um éster em uma reação para a obtenção de saponificação, da origem a um sal e um álcool. Estudos como descrito por Prentice-Hernandes *et al.* (1993), Nachtigall *et al.* (2009) e Tocchini e Mercadante (2001) indicam que os álcalis hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH) apresentaram melhores resultados no estudo que realizaram, com o objetivo de realizar uma reação de saponificação.

Portanto, as duas bases foram também testadas, objetivando a quebra do éster monometílico da bixina presente no extrato de urucum em acetona, para a obtenção de norbixina.

A Figura 10 mostra o comportamento do hidróxido de sódio e do hidróxido de potássio durante a reação de conversão, utilizando extrato de semente de urucum em temperatura de 30 °C por tempo de 1 hora e reação.

Figura 10. Comportamento de soluções a 0,5 M de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) durante reação de saponificação e suas respectivas equações de coeficiente angular.

A reação foi monitorada de acordo com a redução da absorbância da bixina a 470nm. Observa-se pelo gráfico obtido através dos dados gerados pelo Kinetcs, a redução da absorbância da bixina no espectrofotômetro. Além disso, foi feito o calculo de $Abs - Abs_0$, para melhor visualização da taxa de redução de absorbância dos dois ensaios.

Desta forma, como pode-se observar pela Figura 10 que o (KOH) apresentou maior poder redutor foi estabelecido que os próximos ensaios fossem feitos com base sendo hidróxido de potássio.

Segundo Silva *et al.* e Nachtigall *et al.* (2009) a concentração da base influencia significativamente a resposta da base durante a reação, podendo influencias também as outras variáveis da reação. Assim como a temperatura utilizada durante um areação influencia diretamente nos resultados da mesma.

A Figura 11 apresenta os ensaios realizados com diferentes concentrações de hidróxido de potássio KOH, comparados com um controle utilizando água destilada.

Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de hidróxido de potássio (0,25, 0,5 e 0,75 mol L⁻¹) sobre a conversão de bixina em extratos de sementes de urucum em acetona.

Conclui-se que a base tem efeito na redução da absorbância, o que pode ser comprovado comparando a reta do gráfico correspondente a quando se utilizou água na reação e quando foi utilizada a base.

Em relação à concentração, foi demonstrado que o hidróxido de potássio de com concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ obteve melhor resultado se comparado às outras concentrações além de melhor condição para a dissolução.

Finalmente, estabelecido a natureza e a concentração a serem utilizadas na reação, foi feito ensaio para a determinação da temperatura a ser trabalhada durante a reação.

Figura 12. Comportamento da base hidróxido de sódio com concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes temperaturas de 30 e 70°C .

Foi observado que para o tempo de reação, a utilização de temperatura de reação a 70°C apresentou melhor desempenho na redução da absorbância da bixina acompanhado por espectrofotômetro. Na Figura 12 os resultados da reação realizada utilizando o extrato de urucum, somado ao hidróxido de sódio KOH a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ comparando as temperaturas de 30°C e 70°C , comprovam o fato.

No entanto, alguns estudos como em Prentice-Hernandez *et al.* (1993) e Scotte *et al.* (2009) reportaram que, assim como os carotenoides que possuem um sistema de duplas ligações conjugadas tornando-se suscetíveis a reação de degradação por temperatura, oxigênio, pH e luz, a bixina é também instável em temperaturas mais altas. Com isso, a

melhor forma de se trabalhar com a amostra, nas condições desse estudo foi utilizando temperatura a 30°C.

Após essas etapas foram determinada a utilização de hidróxido de potássio KOH como base, em concentração de 0,5 mol L⁻¹ em temperatura de reação de 30°C.

Determinadas as condições ótimas de trabalho, foram realizados três ensaios de conversões. O material coletado durante a reação (tempo: 0min, 60 min, 120 min) foi analisado em espectrometria de massas. Os espectros referentes à análise de identificação dos compostos durante a reação de conversão dos carotenoides bixina em norbixina, obtidos em espectrômetro de massas, estão apresentados na Figura 13, 14, 15 e 16.

Antecedendo a análise, cada amostra da reação foi misturada com clorofórmio, com o objetivo de se obter espectros mais limpos, evitando assim a interferência do hidróxido de potássio.

Com a análise em espectrômetro de massas utilizando o V-EASI foram identificados os íons com abundância relativa predominantes: $m/z = 393$; $m/z = 255$; $m/z = 279$; $m/z = 379$. Sendo estes íons são conhecidos por bixina, ácido palmítico, ácido linoleico e norbixina, respectivamente. Houve a presença de outros íons dominantes, mas que não foram identificados, como: $m/z = 438$; $m/z = 455$; $m/z = 480$; $m/z = 311$.

Como observado na Figura 13, no espectro obtido no tempo 0 da reação, apresenta o íon predominante identificado pelo equipamento sendo a bixina, representada pela massa $m/z = 393$, visto que a massa molecular da bixina é 394 g/mol e produziu o íon $[M-H]^-$ $m/z = 393$. Ressaltando a presença da bixina na amostra analisada no tempo inicial da reação.

Seguindo a reação, após 60 minutos, foi observado o desaparecimento do espectro de bixina e aparecimento de espectros variados, podendo significar outros compostos presente nas sementes, visto que a abundância relativa diminuiu (de 1.000.000 para 100.000×), ou até mesmo a possível degradação da bixina em compostos de cadeia carboxílicas menores (Figura 14).

Ainda no tempo de 60 minutos, foi possível observar, a predominância de outros compostos como ácido palmítico $m/z = 255$ e ácido linoleico $m/z = 279$. Segundo Alonso (2004) sementes de *Bixa orellana* (urucum) encontra-se em sua composição altas concentrações de proteínas, seguida de lipídeos, carboidratos e minerais. Porém, também

apresentam teor considerável de ácidos graxos insaturados, como linoleico e oleico. Sendo pertinente a presença de ácidos graxos nas amostras analisadas, dado que, como descrito no item 3.2.2.2 deste estudo, para a extração dos carotenoides das sementes é feita a trituração das sementes, sendo possíveis que nessa etapa de extração foram carreados conjuntamente outros compostos, assim como os encontrados durante a análise de espectrometria.

Figura 13. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro do tempo inicial da reação.

Figura 14. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro após 60 minutos de reação.

Figura 15. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro após 60 minutos de reação, com adição de HCl 6N e em seguida filtrado, precipitação da norbixina e dissolvida em metanol.

Figura 16. Espectros obtidos por espectrômetro de massas V-EASI. Espectro após 120 minutos de reação.

No que diz respeito à Figura 15, uma alíquota da solução de reação durante o tempo, também de 60 minutos, foi separada e nela foi adicionada 1 mL de HCl 1%. Com a adição de ácido no meio, observou-se a formação de precipitado. Segundo Carvalho (1991) e Pimentel (1999), a acidificação do extrato alcalino das sementes de urucum possibilita a precipitação da

norbixina presente no meio, tornando esse precipitado possível de separação da solução. No estudo em questão, após a dição de ácido, também se obteve o precipitado de norbixina, e este foi separado através de filtração com papel filtro e o conteúdo sólido filtrado foi dissolvido em metanol grau HPLC. Foi possível a identificação de norbixina na solução, sendo a presença confirmada no espectro de massa $m/z = 379,3$.

Além do espectro de norbixina, também foi possível detectar a presença significativa do íon $m/z = 414,9$. Este íon pode ser atribuído a norbixina dado que como a solução de reação foi acidificada com HCl, a norbixina, no caso, apresenta-se clorada. Isso pode ser explicado pelo fato de a massa molecular do HCl ser 36,46 g/mol, quando ligado a molécula de norbixina se apresenta como $m/z = 414$.

A leitura referente à alíquota coletada após 120 minutos de reação resultou no espectro representado na Figura 16. Pode-se observar que não há identificação dos compostos bixina e norbixina. No entanto, a presença de outros compostos de menores intensidades foi identificada. Isso pode ser explicado pelo fato de a bixina ter degradado dando origem a outros compostos.

Como descrito por Rodriguez-Amaya (1988), a bixina, ou os carotenoides em geral apresentam baixa estabilidade, principalmente quando expostos em oxigênio, mas também a luz e temperaturas elevadas. Portanto, isso pode explicar a ocorrência de degradação da bixina durante a reação.

Também se pode considerar a forma de separação antes de analisar em espectrômetro de massas. Devido à sensibilidade do equipamento e a realização por infusão direta, ou seja, ionização das moléculas presentes na sem nenhuma separação, pode ocorrer supressão iônica. Com isso, pode ocorrer a competição pela ionização entre componentes da matriz e o analito desejado. No caso, componentes presentes na solução, ou do próprio extrato podem ter mascarado o sinal norbixina.

Os resultados obtidos na identificação por espectrometria de massas indicam as condições da reação não foram suficientes que a conversão de bixina extraído da semente em norbixina, podendo ser identificada por espectrometria de massas, porém não foi possível avaliar o rendimento. Isso mostra que as condições para a reação direta, precisam ser mais bem acuradas para que se obtenha um melhor rendimento, objetivando o maior oferecimento desse carotenoide. Além disso, o método de extração dos carotenoides para ser identificado no

espectrômetro de massas deve também ser ajustado de forma que reduza as interferências durante a análise.

4.2.3.2. Atividade antibacteriana

Pelo método de difusão em ágar ou teste de difusão em disco a atividade antimicrobiana da amostra é identificada através da observação de halos inibitórios próximos aos discos. Além disso, dependendo do tamanho de halo apresentado em milímetros, pode-se avaliar se o microrganismo é sensível ou resistente ao agente antimicrobiano (NCCLS, 2003).

Em relação aos extratos de urucum, em nenhuma das placas, com os três diferentes tipos de bactérias utilizados, houve inibição de crescimento dos microrganismos, como pode ser observado na Figura 17. Nas placas, as siglas representam, EU: Extrato de Urucum [20 mg/ml], CS: Controle Negativo contendo o solvente utilizado nos extratos (acetona p.a.) e AZ: Controle positivo contendo antibiótico [131,5 mg/ml].

Figura 17. Placas da avaliação da atividade antioxidante. *Bacillus subtilis* - a; *Staphylococcus aureus* - b; *Bacillus stearothermophilus* - c.

O controle positivo, disco azitromicina, apresentou comportamento conforme o esperado. Observou-se a formação de halo de inibição indicando a eficiência do método. Em relação ao controle negativo, utilizando o solvente acetona, observou-se que este não

interferiu na avaliação da atividade antimicrobiana, uma vez que quando testado sozinho não promoveu formação de halo de inibição de crescimento bacteriano.

Portanto, não se evidenciou atividade antimicrobiana do extrato pela técnica de difusão em ágar. Alguns trabalhos que estudaram a atividade com *B. orellana* mostram resultados positivos, no entanto, utilizando outras partes da planta, com concentrações maiores e também apresentam resultados de inibição para outros tipos de bactérias.

Como no estudo de Arruda (2016), que utilizou o método de difusão em ágar para avaliar a inibição de microrganismos utilizando extrato hidroetanólico de sementes urucum com concentração de 320mg/mL, no entanto, apresentou inibição para os microrganismos *S. pyogenes*. Coelho et al. (2003), avaliou a inibição de *Pseudomonas aeruginosa* frente a extratos preparados utilizando folhas de urucum, caule, frutos e raiz. Seus resultados mostraram que todas apresentaram halo de inibição. No entanto, os resultados mostraram que a *P. aeruginosa* apresentou grande sensibilidade ao extrato das folhas de urucum, entretanto, o microrganismo apresentou resistência ao extrato hidroalcoólico de sementes de urucum.

4.3 Conclusão

Foi possível obter norbixina a partir de extrato de bixina utilizando reação de saponificação e também foi possível à identificação de bixina e norbixina em espectrômetro de massas. Porém, não foi possível quantificar o rendimento da reação.

Em relação à atividade antimicrobiana, os extratos testados não apresentaram poder de inibição bacteriana, esclarecendo que os extratos não são eficientes para a inibição do crescimento das bactérias utilizadas.

Referências

ARRUDA, M.O. Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória de produtos naturais sobre patógenos respiratórios. 190 p. Tese [Doutorado Programa de Pós-Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS. Universidade Federal do Maranhão. 2016.

- BASTOS, A. R. R.; CARVALHO, J. G.; ASSIS, R. P.; CECÍLIO FILHO, A. B. Marcha de absorção de nutrientes em urucum (*Bixa orellana* L.) “tipo cultivado” piave vermelha em fase de viveiro. **Cerne**, v. 5, n. 2, p. 76-85, 1999.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.267-71, 2007.
- BOUVIER, F; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.B.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M., ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1523-1527, São Paulo, 2009.
- CARVALHO, P.R.N. Carotenoides. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, Campinas, 1991. Campinas, ITAL, p. 59-62, 1991.
- COELHO, A.M.S.P.; SILVA, G.A. de; VIEIRA, O.M.C.; CHAVASCO, J.K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, dez 2003.
- COLLINS, P. The role of annatto in food colouring. **Food Ingredients and Processing International**. Hertfordshire, UK: Turret Group plc. p. 23-27. 1992.
- FABRI, E.G; TERAMOTO, J.R.S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, v. 33, n. 1, p. 140, Mar. 2015.
- FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; FILHO, J.C.; NETO, M.B.; SÃO JOSÉ, A.R.; FONTINELLI, I. S. C. Urucuzeiro: **Agronegócio de Corantes Naturais**. 1º ed., EMEPA, João Pessoa, PB, p. 120, 2002.
- GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.53, n.7, p.2524-9, 2005.

- GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v.42, n.8, 2012.
- GONÇALVES, A.L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-8, 2005.
- HADDAD R, SPARRAPAN R, KOTIAHO T, EBERLIN MN. Easy ambient sonicspray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. **Analytical Chemistry**. n.80, p.898-903, 2008.
- HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 4557, 1994.
- LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T. I.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGUETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary and Research Animal Science** v. 38, n. 4, p.196-200, 2001.
- LIVERMORE, D.M. Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p.1-7, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2. ed . 2008. 576 p.
- LORDEIRO, R.A. 2011. 98p. Dissertação (Mestrado em Química-Química Analítica) Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2011.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification a new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Journal Agricultural and Food Chemistry* v. 45, p. 1050-1054, 1997.
- MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmação da identidade da α -criptoxantina e incidência de carotenoides minoritários provitamínicos a em verduras folhosas verdes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21. n.2, p. 216-222, maio-ago. 2001.

- MURRAY, K.K, BOYD, R.K, EBERLIN, M.N., LANGLEY, G.J, LI, L.,NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry. Pure Applied Chemistry, v. 85, n.7. 2013.
- NACIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 8. ed. Wayne: NCCLS, 2003. 58 p. NCCLS document M2-A8.
- NACHTIGALL, A.M.; SILVA,P.I.; BERTOLDI, M.C.; STRINGHETA, P. C. Estudo da saponificação em pigmentos de urucum. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2009.
- NALIMOVA, M.S; PEÑA, S.G.R.; IZQUIERDO, M.F.C. Efecto in vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del gênero Xanthomonas. **Fitosanidad**, v.9, n.3, p.49-51, 2005.
- NASCIMENTO, G.G.F; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bactéria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.247-56, 2000.
- OLIVEIRA, J.S. Purificação de compostos de urucum por processo absortivo. 185p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2005.
- PIMENTEL, F.A. Avaliação de métodos de obtenção e de estabilidade de pigmentos de sementes de urucum. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 1995. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- PIMENTEL, F.A.; STRINGUETA, P.C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.3, p. 53-57, 1999.
- PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. R. N. Influência do Tempo de Aquecimento na Degradação Térmica de Bixina em Extratos Alcalinos de Urucum (*Bixa orellana* L.). v. 36, n. 4, p. 819-828, 1993.

- RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em snacks extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**. v. 3, n. 15, p. 203-213, 2004.
- ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicines**, v.6, n.1, p.2-12, 2006.
- SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, Processing and Toxicology of Annatto (*Bixa orellana* L.) *Journal of Food Science and Technology*. v. 40, n. 2, p. 131-141, 2003.
- SCOTTER, M.J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chemistry**, v. 74, p. 365–375. 2001.
- SILVA, P.I.; NACHTIGALL, A.M.; STRINGHETA, P. C. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). **Ciência e agrotecnologia**. v.33, pp.1892-1897. 2009.
- SCHWAB, N.V. Explorando novas metodologias em espectrometria de massas com ionização ambiente e fluorescência de raios x por dispersão em energia. 2015. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2015.
- TEGA, D. U. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de metanol em biocombustíveis e gasolina por espectrometria de massas utilizando uma fonte V-EASI. Dissertação de mestrado. Campinas-SP. 2015.
- TAGURI, T.; TAKASHI, T.; KOUNO, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 29, n. 11, p. 2226-2235, 2006.
- TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, p. 310-313, 2001.

VIUDA, M.M.; GOMEZ, G.L.; NAVAJAS, Y.R. In vitro antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa orellana* L.) leaves and seeds. Journal of Food Safety, v. 32, p. 399–406, 2012.