
TEOR DE BIXINA EM DUAS VARIEDADES DE *Bixa orellana* L. CULTIVADAS NO PARANÁ

CONCENTRATION OF BIXIN IN TWO VARIETIES OF *Bixa orellana* L. CULTURED IN PARANA

^{1,3}GOLIN, Samanta Daliana;^{1,2} ROCHA GARCIA, Carlos Eduardo; ^{1,2}BARREIRA, Sandra. M. W; ^{1,4}BEDNARCZUK; Vinícius.Oliveira, ^{1,4}STRAPASSON, Giovanna Chipon, ^{1,3}ZUCHETTO, Marileda; ^{1,2}MIGUEL, Obdúlio Gomes.

1 -Universidade Federal do Paraná. Departamento de Farmácia. Projeto de Extensão Farmacêutico de Alimentos.

2 - Docente do Curso de Farmácia.

3 -Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPR,

4 -Doutoranda(o) no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPR

E-mail: samantagolin@ufpr.br

RESUMO:

Urucum, *Bixa Orellana* L., é uma árvore pequena da família Bixaceae, nativa da América do Sul e Central, difundida nos trópicos. A bixina pigmento natural representa 80% de todos carotenoides presente na semente do urucum, possui cadeia mais curta (25 C) do que os habituais carotenoides (C 40), a bixina também possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas, o que lhe confere algumas características especiais. Das metodologias utilizadas para extração, o Soxhlet é um dos que permite um rendimento maior. Esta extração resulta em produtos distintos quanto à qualidade e concentração de ativos. As sementes das duas variedades de *Bixa orellana* cultivadas em Morretes Paraná analisadas, apresentaram as seguintes concentrações após a extração utilizando soxhlet e solventes em ordem crescente de polaridade, na variedade vermelha, fração hexano 6,59%, clorofórmio 5,07% de bixina isolada, acetato de eitle 0,75% e fração hidroalcoólica 5,75%, enquanto a variedade verde fração hexano 6,79%, clorofórmio 3,28% de bixina isolada, acetato de eitle 0,87% e fração hidroalcoólica 4,8%. Observou-se a presença cristais 1,378%, que foram identificados como sendo sacarose na variedade vermelha após algum tempo em repouso.

PALAVRAS-CHAVES: bixina, annatto, soxhlet, extração, urucum, fitoquímica

ABSTRACT:

Urucum (annatto or *Bixa Orellana* L.), a small tree Bixaceae family, is native to South and Central America and is widespread in the tropics . The natural pigment is bixin 80% of all carotenoids present in the seed of the annatto, has shorter chain (25 C) than the usual carotenoids © 40), bixina also has a chain of conjugated double bonds, which will confers some special features. Of methodologies for extraction, Soxhlet is one that allows the highest yield. This concentration results in different products in quality and

concentration of assets. The seeds of two varieties of *B. orellana* L. grown in Morretes - Paraná analyzed, showed the following concentrations after extraction using Soxhlet and solvents in order of increasing polarity, the red variety, hexane fraction 6.59%, chloroform 5.07% bixin isolated, acetate 0.75% and 5.75% hydroalcoholic fraction, while the green variety hexane fraction 6.79%, chloroform 3.28% bixin isolated from acetate 0.87% and 4.8% hydroalcoholic fraction. We observed the presence of 1.378% crystals, which were identified as being sucrose in the red variety after some time resting.

KEYWORDS: bixin, achiote, Soxhlet, extraction, phytochemistry

1. INTRODUÇÃO

Bixa Orellana L., conhecida popularmente no Brasil como urucum, uma árvore pequena da família Bixaceae, é nativa da América do Sul e Central sendo difundida nos trópicos. A bixina pigmento natural da semente do urucum, um apocarotenoide representa 80% de todos os carotenoides presentes, possui cadeia mais curta (25 C) do que o habitual carotenoides (C 40), a bixina também possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas, o que lhe confere algumas características especiais. Nas sementes da planta, a bixina está presente na forma *cis* instável, que pode ser convertido para a forma *trans* estável com o calor, ou com uso de solventes orgânicos para extração (BARETH et al., 2002; KOUL et al., 2003; RIOS & MERCADANTE, 2004; TOCCHINI & MERCADANTE, 2001).

Os carotenoides extraídos da semente do urucum que podem variar do amarelo e vermelho, são muito utilizados na indústria alimentícia para colorir produtos lácteos, salsichas, carnes e doces, (MARCOLINO et al. 2011), e também nas indústrias têxteis e cosméticas (COSTA, 2007).

Dentre os corantes naturais, a bixina é um dos poucos permitidos pela OMS, porque além de não ser tóxico, não altera o sabor dos alimentos (MORSBACH, 1996), frações extraídas do urucum mostraram também atividade antioxidante (COSTA, 2007; GOLIN, 2013).

América Latina é a principal produtora mundial de urucum (*B. orellana* L), apresentando uma produção anual de aproximadamente 17 mil toneladas, das quais 12 mil são originárias do Brasil (TOCCHINI, MERCADANTE, 2001).

Das metodologias utilizadas para extração, o Soxhlet é um dos que permite um rendimento maior. Esta extração resulta em produtos distintos quanto à qualidade e concentração de ativos (CARVALHO, 2001).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Botânico

As sementes de *Bixa orellana* L, pertencentes a duas variedades: “Casca verde”, “Casca vermelha” coletadas: Local IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná. Rod. Miguel Buffara, km 8, Morretes_ Paraná, Brasil. Caixa Postal nº 11 - 83350 000 Fone/Fax: 55 (41) 3462-1203, Estação Experimental de MorreteEST.: Morretes / CÓD.: 02548038 / LAT.: 25°30´S / LONG.: 48°49´W / ALT.: 59m.

A Coleta realizada nos meses de junho e julho de 2012, coletada a variedade vermelha aproximadamente 2900Kg e a variedade verde com 5000Kg de sementes frescas.

A identificação botânica da espécie foi realizada no Museu Botânico Municipal da prefeitura de Curitiba pelo curador Osmar dos Santos Ribas, em comparação com exsicata catalogada no herbário sob o número: 379.394.

2.2 Fragmentação das sementes

As sementes foram removidas manualmente dos frutos, e colocadas para secar em estufa de ventilação a 50°C, até completa desidratação, após a estabilização, o material foi triturado e a padronização granulométrica foi realizada pelo método da Embrapa 1996.

2.3 Extração

As sementes secas, variedade vermelha (798g) verde (2200g) foram submetidas à extração em aparelho de soxhlet durante 6 horas com hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica (CARVALHO, 2009).

No Soxhlet com aplicação farmacotécnica, há substituição do sistema de percolação por uma placa de teflon perfurada (Figura 1) e recoberta com algodão, com o objetivo de filtrar a solução extratora eluída (CARVALHO, 2009).

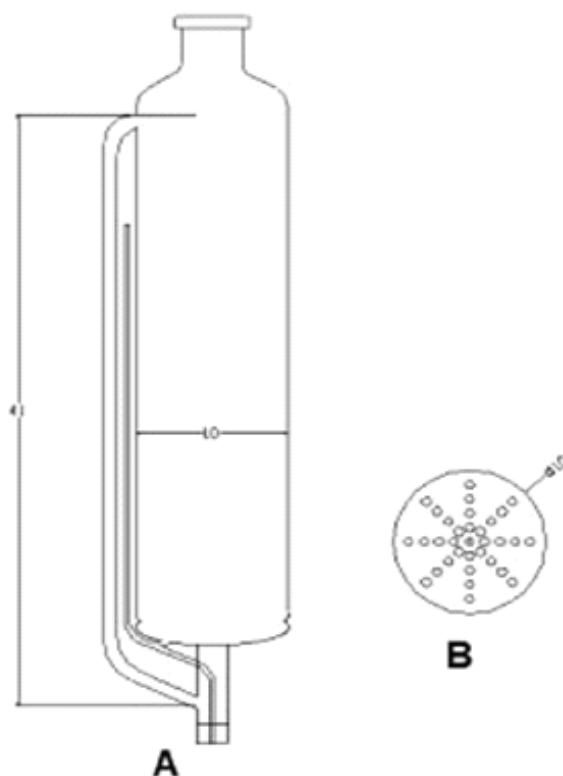


Figura 1. Soxhlet farmacotécnico, onde A = sistema Soxhlet (10cm de diâmetro e 41 cm de altura) e B = placa de teflon (10cm de diâmetro).

Em seguida, o líquido extraído foi filtrado para remoção de qualquer impureza e então concentrado em roto evaporador para eliminação do solvente.

Os rendimentos foram obtidos considerando-se o peso inicial das sementes secas e moídas. O armazenamento foi feito em frascos de vidro âmbar, fechados e em refrigeração para evitar oxidação e/ou rancificação.

2.4 Identificação do cristal

2.4.1 Ponto de Fusão

Os cristais obtidos da fração clorofórmio apresentaram ponto de fusão de 195 °C, que corresponde ao valor encontrado por SILVA(2000) para a bixina.

2.4.2 Análise em Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros no infravermelho das substâncias isoladas foram obtidos com amostras preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro (KBr) comprimidas

em equipamento Bomem - Hartmann & Braum MB-Serie. A varredura foi feita de 400 a 4000 cm^{-1} , leitura de transmitância e detector DTGS. As amostras foram pastilhadas com brometo de potássio (KBr).

2.4.3 Análise em RMN

O espectro de RMN de ^1H e DEPT 135° das substâncias isoladas foram obtidos do equipamento Bruker Topsis 1.3 200 MHz do Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No mundo inteiro são conhecidos 40 variedades de urucum espalhados pelo mundo inteiro. No Paraná o IAPAR em uma pesquisa coordenada por Morsbach (1996) introduziu 20 (vinte) variedades em Morretes e Paranavaí. No entanto, nos parâmetros de produtividade, somente a IAC 530 e IAC 062 mostraram-se razoáveis para os três quesitos: número de cachos por plantas, número de cachopa por cacho e número de grãos por cachopa.

A maioria das introduções mostrou ciclo precoce e médio. Somente 3 (três) apresentaram ciclo tardio: Piave vermelha, IAC 018 e IAC 11. Esta última é tão tardia que o florescimento inicia no outono-inverno dificultando a formação e o amadurecimento das cápsulas. Piave vermelha, pelo fato de ser mais tardia, é suscetível ao oídio. Essa doença que aparece com maior intensidade na época fria e seca diminui a capacidade de fotossíntese das folhas e por conseguinte, reduz a produção (MORSBACH, 1996).

Neste trabalho as sementes secas, estabilizadas e trituradas, de ambas variedades verde e vermelha, foram submetidas a extração com gradiente de polaridade crescente hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol em aparelho de soxhlet modificado (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 1999; COSTA, 2007), cujos resultados estão descritos na tabela 1.

Na fração clorofórmica, ainda no momento da extração, já se detectava a presença de cristais no fundo do balão. Após o término do processo, essa fração foi filtrada em funil de Buchner, e que se apresentaram brilhantes e de cor vermelho-púrpura. Esses cristais foram lavados com clorofórmio gelado para remoção de impurezas, secos, armazenados em um frasco âmbar e conservados sob refrigeração.

De acordo com COSTA, (2007), SILVA (2000) e BARBOSA FILHO et al. (1998), esses cristais correspondem à *bixina, principal constituinte do corante.

TABELA 1 - RENDIMENTOS EM ÓLEOS, SÓLIDOS E BIXINA EM VARIEDADES DE *Bixa orellana* CULTIVADAS EM MORRETES PARANÁ.

Variedades analisadas	Granulometria	Hexano fração oleosa	Clorofórmio []bixina	Acetato-etila	Hidroalcoólica
casca vermelha	455,83 μ m	6,59%	5,07%	0,75%	5,75%
casca verde	635,78 μ m	6.79%	3,28%	0,87%	4,8%

A identificação de bixina foi feita por através de análise espectral de IV, UV, e RMN de ^1H comparados com dados da literatura, Dessa forma, a análise dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT e HMQC e dados de literatura (OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007) permitiram caracterizar o cristal obtido como sendo o corante bixina*, conforme tabela 2.

O espectro de IV, apresentado , mostrou uma banda do grupamento hidroxila em $3143,96\text{ cm}^{-1}$, as metilas e metilenos alifáticos em $2947,22$ e $2881,64\text{ cm}^{-1}$, e a carbonila em $1716,64\text{ cm}^{-1}$, conforme figura 1. Esses grupamentos também estão presentes na estrutura química do corante bixina.

O espectro de RMN de ^1H para a amostra analisada, representado na figura 2, apresentou sinais de deslocamento químico entre 1,91 -1,96 ppm que correspondem a próton das metilas ligadas aos carbonos vinílicos, um singlete em 3,68 ppm que corresponde a metoxila do grupamento éster e também dois pares de dubletes em 5,79 / 7,23 e 5,90 / 7,85 ppm atribuídos respectivamente a H_α / H_β aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster. Também apresentou multipletos entre 6,41 a 6,90 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de deslocamento químico em 167,7 e 166,9 ppm referentes aos carbonos das carbonilas de ácido e éster, respectivamente. Também apresentou sinal de deslocamento em 51,4 ppm referente ao carbono da metoxila do éster. Na região de 120 a 148,2 ppm observou-se multiplicidade de sinais correspondentes aos carbonos sp^2 da cadeia vinílica e na região entre 12 -20 ppm os sinais de deslocamento de carbonos das metilas ligadas aos carbonos vinílicos (figura 3).

TABELA 2 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DO CRISTAL E CORRELAÇÃO HMQC

CARBONO*	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^{13}\text{C}^c$	HMQC c $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
1	167,9	167,8	167,8	
2	117,3	117,2	117,2	5,79
3	131,2	131,2	131,2	
4	148,2	148,2	148,2	7,23
5	131,4	131,4	131,4	
6	140,6	140,6	140,6	
7	138,0	138,0	138,0	
8	139,0	139,1	139,1	
9	134,6	134,5	134,5	
10	133,4	133,4	133,4	
11	131,3	131,3	131,3	
12	134,7	134,7	134,7	
13	-	136,7	136,7	
14	136,7	136,7	136,7	
15	123,1	123,1	123,1	
16	124,8	124,8	124,8	
17	140,0	139,9	139,9	7,85
18	141,5	141,4	141,4	
19	117,7	117,6	117,6	5,90
20	166,9	166,9	166,9	
21	51,4	51,4	51,4	3,68
22	19,9	19,9	19,9	1,91 – 1,96
23	13,9	12,6	12,6	1,91 – 1,96
24	12,7	12,5	12,5	1,91 – 1,96
25	12,6	12,4	12,4	1,91 – 1,96

^a OLIVEIRA, J.S. Purificação de compostos de urucum por processo adsorptivo, Florianópolis, 2005, 185f. Tese (doutorado em Eng^a Química), UFSC.

^b COSTA, C.K. Estudo fitoquímico de *Bixa orellana*, Bixacea e aplicação de óleo em formulação cosmética, Curitiba, 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPR.

^c Medidas feitas observando-se o núcleo de ^1H a 200 MHz e ^{13}C a MHz, DMSO, ppm.

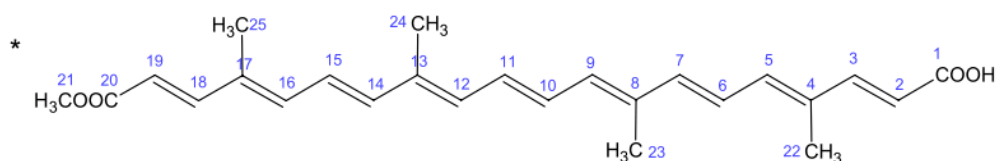
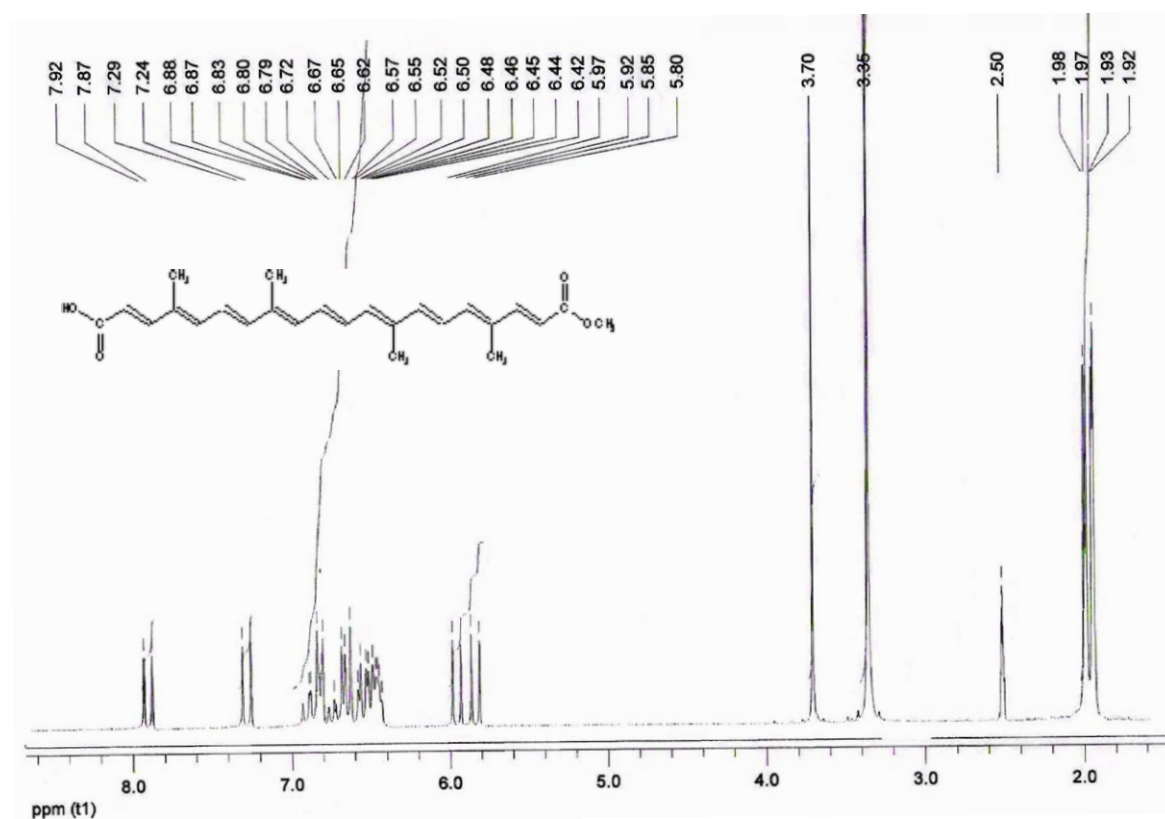
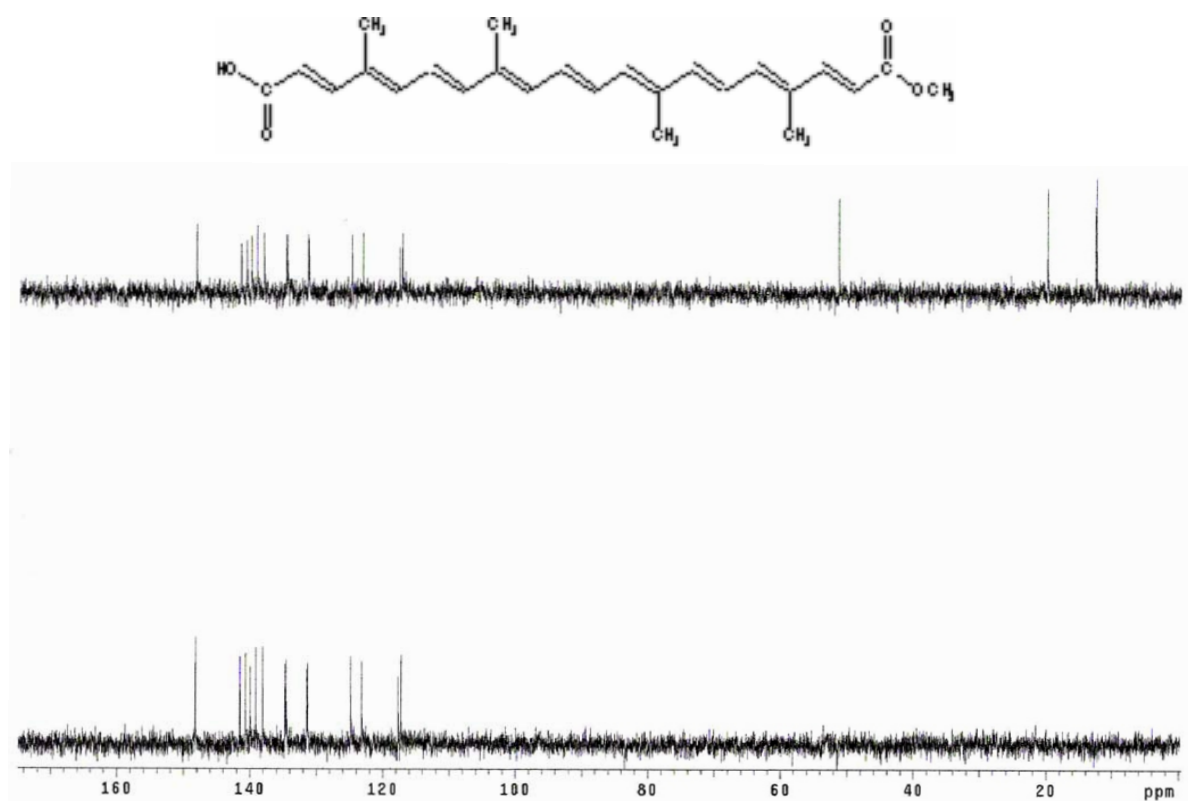
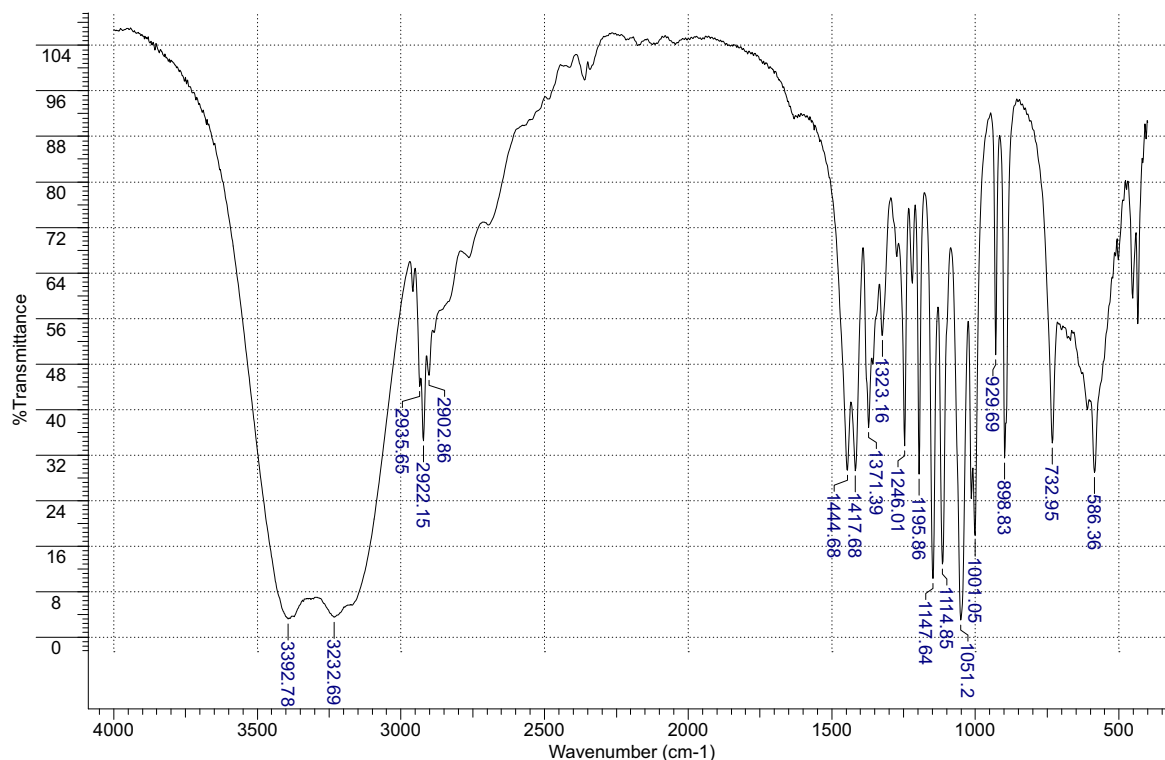


FIGURA 2 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO CRISTAL (200MHz, DMSO)**FIGURA 3 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO CRISTAL (75MHz, DMSO)**

A extração a fração etanólica da variedade vermelha, após algum tempo em repouso, apresentou uma cristalização e precipitação de cristais no fundo do Erlenmeyer, cerca de 1,378%. Esta cristalização não ocorreu na variedade verde. Os cristais precipitados foram analisados no IV (figura 4) e RMN ^1H e RMN ^{13}C , onde seus resultados coincidiram com a sacarose conforme literatura.

FIGURA 4 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE IV DA SACAROSE EM KBr



4. CONCLUSÃO

As sementes de duas variedades de *Bixa orellana* cultivadas em Morretes Paraná analisadas, apresentaram as seguintes concentrações após a extração utilizando soxhlet e gradiente de polaridade, na variedade vermelha, a fração hexano 6,59%, clorofórmio 5,07% de bixina isolada, acetato de eitla 0,75% e fração hidroalcoólica 5,75%, enquanto a variedade verde fração hexano 6,79%, clorofórmio 3,28% de bixina isolada, acetato de eitla 0,87% e fração hidroalcoólica 4,8%. Observou-se a presença cristais 1,378%, que foram identificados com sendo sacarose na variedade vermelha após algum tempo em repouso.

5. REFERÊNCIAS

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, 2004. p. 41-45.

ANGELUCCI, E. Corantes para alimentos. Legislação Brasileira. I Seminário corantes para alimentos. Campinas 1989. Resumos. ITAL/SBCTA. 14p.

BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. **HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese**. *European Food Research and Technology*, Heildeberg, v. 215, n. 4, p. 359-364, 2002.

CANTO, W. L.; OLIVEIRA, V.P., P,R.N., GERMER, S. P. M. **Produção e Mercado Brasileiro de Urucum no Brasil. Estudos econômicos – alimentos processados ITAL**. Campinas n°28, 65p. 1991.

CARVALHO, J. L. S.; **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. br., brassicaceae**. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2001.

CARVALHO, João Luiz de Souza et al . Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000400034&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Feb. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400034>.

CORRÊA, M. Pio; PENNA, Leonam de Azeredo (Col.). **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 6. p.358-359.

COSTA, C.K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana*, Bixacea e aplicação de oleo em formulação cosmética**, Curitiba, 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPR.

EMBRAPA–CNPSA, CT / 215 / Dezembro/1996. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot215.pdf; acesso em 19/02/2013.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÓES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

FERREIRA, V.L.P. Teoria da cor. 1. **A importância da cor na aceitação dos**

alimentos. In: Seminários de Corantes Naturais para Alimentos. I Simpósio internacional de Urucum (Anais). IAL/IAC. Campinas. Pg. 7-34. 1991.

GARCIA, Carlos Eduardo Rocha et al . Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, Aug. 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000800029&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Feb. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000800029>.

GHIRALDINI, J.E. Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos**, p. 20-25, 1989. Campinas.

GOLIN, Samanta; *et al.* The antioxidant potential of the Annatto. **CIFARP 2013**. Disponível em http://www.cifarp.com.br/painel/_inc/trabalhos/resumo1958.pdf. Acesso, 03/12/2013.

KOUL, V. K.; KOUL, S.; TIKOO, C. L. **Process optimization for extraction and purification of bixin from annatto**. Indian Journal of Chemical Technology, New Delhi, v. 10, p. 545-547, 2003.

MORSBACH, Nancy; LUGÃO Simony Marta B. **Alternativas vegetais diversificadas para o desenvolvimento de regiões paranaenses**. IAPAR-Instituto Agronômico do Paraná. Curitiba – 1996.

OLIVEIRA, J.S. **Caracterização, extração e purificação por Cromatografia de compostos de urucum (bixa orellana L.)** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Florianópolis 2005.

OLIVEIRA, V.P.de. Agroindústria de urucum no sudoeste do Brasil. Palestra. II Seminário de corantes Naturais para alimentos . I **Simpósio Internacional de Urucum**. Campinas. IAL/IAC. Pg. 163-164. Resumos. 1991.

PINO, J. A.; CORREA, M. T. Chemical composition of the essential oil from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 66-67, mar./apr. 2003.

RIOS, A. de 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.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. **Extraction and determination of bixin and orbixin in annatto spice (" colorí fico ")**. Cienc. Tecnol. Aliment. , v 21,P. 310 – 313, 2001.