

POLLYANNA IBRAHIM SILVA

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIXINA E
NORBIXINA EM SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586m
2007

Silva, Pollyanna Ibrahim, 1981-

Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) / Pollyanna Ibrahim Silva. – Viçosa : UFV, 2007.

xii, 145f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 138-145.

1. Alimentos - Aditivos. 2. Extração (Química). 3. Corantes.
4. Urucum - Análise. 5. Bixina. 6. Norbixina. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.07

POLLYANNA IBRAHIM SILVA

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIXINA E
NORBIXINA EM SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 1º de fevereiro de 2007

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira
(Co-Orientadora)

Prof^a. Maria Beatriz Abreu Glória

Prof. Milton Nobel Cano-Chauca

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Paulo César Stringheta
(Orientador)

À minha mãe, Verônica,
Ao meu irmão, Vinícius,
À minha sobrinha, Luíza,

DEDICO

Ao meu pai, Edson (*in memoriam*)

OFEREÇO

*“Você não pode ensinar nada a um
homem;
Você pode apenas ajudá-lo a encontrar a
resposta dentro de si mesmo”.*
(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me mostra o melhor caminho a seguir.

Ao professor Paulo César Stringheta, por sua grande contribuição em despertar meu interesse pela ciência, pelos ensinamentos, pela orientação constante, pela agradável convivência e pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade. Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais, Lígia Santana e Valério Poletto, pelo auxílio constante na execução do trabalho e pela valiosa amizade. A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela colaboração.

Aos professores do curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos conhecimentos transmitidos.

À banca examinadora, pelas importantes sugestões.

Aos colegas de laboratório e de curso, Aline, Paula, Michele, Ísis, Priscila, Taíla, Sylvia, Luciano, Fabíola e Miriam, pelo apoio e pela convivência.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais nos últimos quatro anos, pelos ensinamentos e pela amizade conquistada.

Aos colegas dos cursos de pós-graduação, pela grande amizade e pelo companheirismo.

A todos os meus grandes e muitos amigos, especialmente à turminha do Coluni (Abomináveis e meninos), e colegas de Viçosa, pelos inesquecíveis momentos de descontração e pela amizade que atravessa o tempo.

A toda minha família, sempre presente em minha vida, em especial a minha mãe, Verônica, de quem tanto me orgulho, e fonte de amor e apoio incondicionais. Ao meu irmão Vinícius e sua esposa, Cyrana, por sempre acreditarem em minha capacidade de superar desafios. A minha amada sobrinha Luíza, pela infinita alegria que me proporciona, pelo amor que

desperta em mim, e, apesar de pequenina, por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia. A todos os meus tios, tias e madrinha, pelos valorosos conselhos, pela amizade e pelo apoio constante na construção de minha carreira. A meus primos e primas, pela alegre convivência.

A todos aqueles que talvez não tenham sido citados, mas que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho, minha profunda gratidão.

BIOGRAFIA

Pollyanna Ibrahim Silva, filha de Geraldo Edson da Silva e Verônica Ibrahim Silva, nasceu em Brasília, Distrito Federal, em 21 de junho de 1981.

Graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa em janeiro de 2005.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 1º de fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1. Descrição e classificação do urucuzeiro	4
2. Os pigmentos do urucum.....	5
3. Estrutura química dos pigmentos do urucum.....	6
4. Extração dos pigmentos do urucum.....	8
4.1. Atrito e secagem em leite de jorro	9
4.2. Raspagem e peneiramento.....	9
4.3. Lixiviação das sementes com água e agitação.....	10
4.4. Extração com CO ₂ supercrítico	10
4.5. Extração com óleos vegetais	11
4.6. Extração com solvente.....	12
4.7. Extração com soluções alcalinas	14
5. Análise dos pigmentos	20
5.1. Colorimetria.....	20
5.2. Métodos espectrofotométricos	22
5.2.1. Nas sementes de urucum	22
5.2.2. Em extratos e em formulações	24
5.2.2.1. Produtos em que há predominância de bixina	24
5.2.2.2. Produtos em que há predominância de norbixina.....	26
5.3. Métodos cromatográficos.....	28
5.3.1. Cromatografia em camada delgada e em coluna	28
5.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	29
6. Estabilidade do urucum	31
7. Aplicações e benefícios	32
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE URUCUM (<i>Bixa orellana</i> L.) E CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS OBTIDOS	
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. MATERIAL	37
2.2. MÉTODOS.....	37
2.2.1. Caracterização das sementes de urucum.....	37
2.2.1.1. Teor de pigmentos e de umidade das sementes	37
2.2.2. Produção dos corantes de urucum	38
2.2.2.1. Extração com os solventes aquosos.....	38

2.2.2.2. Extração com o solvente alcoólico alcalino.....	40
2.2.2.3. Extração com etanol comercial.....	41
2.2.3. Determinação da eficiência da extração.....	42
2.2.4. Caracterização dos corantes produzidos.....	43
2.2.4.1. pH dos extratos.....	43
2.2.4.2. Teores de bixina e norbixina dos corantes.....	43
2.2.4.3. Teor de umidade.....	44
2.2.4.4. Teor de sólidos totais.....	44
2.2.4.5. Teor de cinzas.....	44
2.2.4.6. Determinação de resíduo de amônia.....	45
2.2.4.7. Determinação de potássio.....	45
2.2.4.8. Caracterização colorimétrica dos extratos brutos e corantes concentrados.....	46
2.2.5. Determinação da curva de cor <i>versus</i> pH.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. Caracterização das sementes de urucum.....	48
3.1.1. Teor de pigmentos e teor de umidade das sementes.....	48
3.2. Eficiência da extração.....	48
3.3. Caracterização dos corantes produzidos.....	49
3.3.1. Extratos líquidos.....	49
3.3.2. Corantes em pó e em pasta.....	51
3.3.3. Caracterização colorimétrica dos extratos brutos e corantes concentrados.....	56
3.4. Determinação da curva de cor <i>versus</i> pH.....	61
4. CONCLUSÃO.....	65
CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS PIGMENTOS DE URUCUM (<i>Bixa orellana</i> L.) OBTIDOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO	
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1. MATERIAL.....	69
2.2. MÉTODOS.....	69
2.2.1. Obtenção dos corantes de urucum.....	69
2.2.2. Identificação e caracterização dos pigmentos nos corantes produzidos.....	71
2.2.2.1. Análise por espectroscopia de infravermelho.....	71
2.2.2.2. Análise por espectrofotometria UV/Visível.....	71
2.2.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	72
2.2.2.3.1. Preparo das amostras de corantes concentrados.....	72
2.2.2.3.2. Preparo dos padrões.....	73
2.2.2.3.2.1. Padrão de bixina.....	73

2.2.2.3.2.2. Padrão de norbixina	73
2.2.2.3.3. Quantificação dos pigmentos por CLAE	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1. Identificação e caracterização dos pigmentos nos corantes produzidos	75
3.1.1. Análise por espectroscopia de infravermelho	75
3.1.2. Análise por espectrofotometria UV/Visível	78
3.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	81
3.1.3.1. Preparo dos padrões	81
3.1.3.1.1. Padrão de bixina	81
3.1.3.1.2. Padrão de norbixina	82
3.1.3.2. Identificação dos corantes concentrados por CLAE	84
3.1.3.3. Quantificação dos pigmentos por CLAE	90
4. CONCLUSÃO	93
CAPÍTULO 3: ANÁLISE QUALITATIVA DOS FATORES QUE INFLUENCIAM A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO EM PIGMENTOS DE URUCUM (<i>Bixa orellana</i> L.)	
1. INTRODUÇÃO	94
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1. MATERIAL	97
2.2. MÉTODOS	97
2.2.1. Influência do tempo de extração na reação de saponificação	99
2.2.2. Influência do tempo de extração e da concentração dos solventes na reação de saponificação	100
2.2.3. Influência do tempo de extração à temperatura de 70 °C na eficiência da reação de saponificação	100
2.2.4. Influência de diferentes temperaturas de extração na reação de saponificação	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1. Influência do tempo de extração na reação de saponificação	102
3.2. Influência do tempo de extração e da concentração dos solventes na reação de saponificação	112
3.3. Influência do tempo de extração à temperatura de 70 °C na eficiência da reação de saponificação	124
3.4. Influência de diferentes temperaturas de extração na reação de saponificação	129
4. CONCLUSÃO	134
CONCLUSÃO GERAL	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

RESUMO

SILVA, Pollyanna Ibrahim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Orientador: Paulo César Stringheta, Co-Orientadores: José Carlos Gomes e Tânia Toledo de Oliveira.

O presente trabalho visou determinar os melhores solventes na extração dos pigmentos do urucum e os métodos de produção de corantes em pó e em pasta. Ainda, foram avaliados métodos de identificação, quantificação e isolamento destes pigmentos, bem como os fatores que influenciam na reação de saponificação da bixina formando a norbixina e seu sal. Na avaliação dos solventes de extração, foram utilizadas soluções aquosas de KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, e soluções de NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial. Os extratos obtidos pelos solventes KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N foram submetidos à secagem em “spray-dryer”, originando corantes em pó. Já os obtidos pelo NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e por etanol comercial foram secos em estufa, originando corantes em pasta. Os extratos e corantes concentrados foram caracterizados quanto ao pH, teores de umidade, sólidos totais, bixina e/ou norbixina, cinzas, amônia, potássio e colorimetria, pela análise das coordenadas “L*”, “a*” e “b*”. Os corantes foram submetidos a técnicas de identificação, como espectroscopia de infravermelho, espectrofotometria UV/Visível e CLAE, para determinar o perfil dos pigmentos presentes. Estes pigmentos foram quantificados por espectrofotometria e CLAE. Foram produzidos padrões de bixina e norbixina de elevado grau de pureza, baseando-se em métodos existentes na literatura. Na análise dos fatores que influenciam na reação de saponificação de bixina formando a norbixina e seu sal, foram realizados ensaios avaliando a influência: (i) do tempo de extração ao se utilizar os solventes KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, à temperatura ambiente, de trinta minutos até 24 horas; (ii) do tempo de extração e da concentração dos solventes, utilizando-se KOH e NH₄OH a 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, por uma e duas horas de extração; (iii) do tempo de extração à temperatura de 70 °C, utilizando-se KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, por uma e duas horas de extração e (iv) de diferentes

temperaturas de extração, utilizando-se KOH 4% a 25, 50, 60 e 70 °C, durante uma hora. As amostras foram analisadas por CLAE e por espectrofotometria. Os resultados indicaram, na avaliação dos solventes de extração, que o solvente mais eficiente foi o NH₄OH 0,5 N em etanol 60%, possibilitando o menor teor de pigmentos residuais nas sementes. O etanol comercial foi o solvente menos eficiente. Quanto ao teor de pigmentos nos extratos, o etanol comercial também apresentou menor poder extrator, enquanto os outros solventes apresentaram desempenhos semelhantes. Os diferentes solventes influenciaram no aumento da concentração de compostos presentes nos corantes produzidos, como cinzas, compostos nitrogenados ou potássio. As coordenadas colorimétricas “L*”, “a*” e “b*” variaram com o pH e com o tipo de solvente extrator. Pela espectroscopia de infravermelho verificou-se a presença da bixina em todos os corantes. Para o isolamento de bixina e norbixina foram desenvolvidas novas metodologias, eficientes e de baixo custo, se comparadas às tradicionais. Pela CLAE constatou-se que a bixina foi o componente majoritário da extração dos pigmentos de urucum quando se utilizou tanto os solventes aquosos alcalinos quanto os alcoólicos. Na análise dos fatores que influenciam na reação de saponificação da bixina a norbixina e seu sal, para a base NH₄OH, o tempo de extração foi o fator que mais influenciou. Para a base KOH, a concentração e a temperatura de extração foram os fatores que mais influenciaram na hidrólise da bixina. Ambas as técnicas de espectrofotometria e de CLAE para quantificação dos pigmentos de urucum forneceram resultados satisfatórios.

ABSTRACT

SILVA, Pollyanna Ibrahim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2007. **Extraction methods and characterization of bixin and norbixin from annatto seeds (*Bixa orellana* L.)**. Adviser: Paulo César Stringheta, Co-Advisers: José Carlos Gomes and Tânia Toledo de Oliveira.

This research aimed to determine the best solvents in the extraction of annatto pigments, and the production methods of powdered and pasty colorants. In addition, methods for identification, quantification and isolation of these pigments were evaluated, as well as the factors that influence in the saponification reaction of bixin to form norbixin and its salt. In the evaluation of extraction solvents, the aqueous solutions of KOH 0,1 N and NH₄OH 0,5 N, and the solutions of NH₄OH 0,5 N in ethanol 60% and commercial ethanol were used. The extracts obtained by the solvents KOH 0,1 N and NH₄OH 0,5 N were submitted to spray-drying, yielding powdered colorants. Those obtained by NH₄OH 0,5N in ethanol 60% and by commercial ethanol were dried in a tray dehydrator, yielding pasty colorants. The extracts and the concentrated colorants were characterized for pH, moisture content, total solids, bixin and/or norbixin, ash, ammonia, potassium and colorimetry by the analysis of the coordinates "L*", "a*" and "b*". The colorants were submitted to identification techniques, as the infrared spectrometry, UV/Visible spectrophotometry and HPLC, in order to determine the profile of the present pigments. These pigments were quantified through spectrophotometry and HPLC. Bixin and norbixin standards of high purity degree were produced, based in methods already existent in the literature. In the analysis of the factors that influence in the saponification reaction of bixin to form norbixin and its salt, experiments were developed in order to evaluate the influence of: (i) extraction time when using the solvents KOH 0,1 N and NH₄OH 0,5 N, at room temperature, from 30 minutes to 24 hours; (ii) extraction time and of solvents concentration when using KOH and NH₄OH at 1%, 2%, 3%, 4% and 5%, during one and two hours of extraction; (iii) extraction time at 70 °C, when using KOH 0,1 N and NH₄OH 0,5 N, during one and two hours of extraction; (iv) different extraction temperatures, when using KOH 4% at 25, 50, 60 and 70 °C, during one hour. The samples were analyzed by means of

HPLC and spectrophotometry. The results indicated, in the evaluation of extraction solvents, that the most efficient solvent was NH_4OH 0,5 N in ethanol 60%, yielding the smallest content of residual pigments in the seeds. The commercial ethanol was the solvent of smallest efficiency. For the pigment content in the extracts, commercial ethanol was also the solvent that showed smaller extraction power, while the other solvents showed similar performances. The different solvents had influence, also, in the increase of concentration of compounds present in the produced colorants, as ash, nitrogenated compounds or potassium. The colorimetric coordinates “L*”, “a*” and “b*” varied with pH, and with the type of extraction solvent. Through infrared spectrometry the presence of bixin in all colorants was verified. For bixin and norbixin isolation, new methodologies were developed. These methodologies, when compared to the traditional ones, were lower-cost and more efficient. By means of HPLC, bixin was the major component from extraction of annatto pigments, when using both the aqueous alkaline and the alcoholic solvents. In the analysis of the factors that influence in the saponification reaction of bixin to form norbixin and its salt, to the alkali NH_4OH , the extraction time was the factor that most had influence. To the alkali KOH , the concentration and the extraction temperature were the factors that most influenced in the bixin hydrolysis. Both spectrophotometry and HPLC techniques for quantification of annatto pigments gave satisfactory results.

INTRODUÇÃO GERAL

A percepção do mundo ao nosso redor é dada pelos nossos sentidos. Desses sentidos, o impacto visual é o mais marcante, sendo definido pela forma, pelo aspecto e pela cor dos objetos. É fato conhecido que a cor é um atributo que influencia de forma decisiva na preferência do consumidor, ao adquirir determinado alimento. Dos três principais atributos de qualidade dos alimentos – cor, sabor e textura, a cor é o mais importante e seguramente o mais notado, tornando-se indicador de qualidade de determinado alimento no momento da compra, e influenciando negativa ou positivamente na percepção dos demais atributos sensoriais (PIMENTEL, 1995; PERIN, 1999).

Considerando que a manutenção da cor original no produto processado e armazenado é importante, a adição dos corantes artificiais tornou-se prática usual, devido à sua maior estabilidade. Para os vários tipos de pigmentos naturais esta manutenção é, muitas vezes, difícil, pelas possibilidades de transformação que estes podem sofrer (BOBBIO e BOBBIO, 1992). O número de corantes artificiais, comprovadamente inócuos à saúde, é, entretanto, pequeno, podendo ser reduzido de acordo com novas pesquisas sobre sua toxidez. A toxicidade de muitos corantes artificiais levou os órgãos responsáveis de vários países a restringir ou até mesmo a proibir a utilização de uma variedade deles.

Com isso, cresce o interesse no uso de corantes naturais, em especial, o urucum (*Bixa orellana* L.), que é um arbusto tropical, cujas sementes apresentam em sua película externa um carotenóide avermelhado

denominado bixina. Este pigmento é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, e de tintas e vernizes. É, também, amplamente utilizado pelos indígenas destes períodos remotos. Do urucum são fabricados os corantes naturais mais difundidos na indústria de alimentos. De suas sementes podem ser obtidos corantes de diversas tonalidades que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho.

O pigmento do urucum é extraído da camada externa das sementes de *Bixa orellana* L., consistindo basicamente de *cis*-bixina, um carotenóide que representa mais de 80% dos carotenóides totais ali presentes. Da bixina são obtidos os demais pigmentos do urucum, como a norbixina. Uma vez que o corante de urucum existe nas formas lipossolúvel e hidrossolúvel, ele pode ser empregado em grande número de produtos alimentícios. Apresenta, também, maior estabilidade se comparado a outros corantes naturais, coloração atrativa e trata-se de uma cultura abundante não somente em regiões tropicais como na América do Sul, mas também em outras regiões do mundo, como Índia e África (SILVA e STRINGHETA, 2005).

Estima-se que mais de 2,8 toneladas/ano de bixina e norbixina sejam consumidos em alimentos como o iogurte, recheio de biscoitos, “snacks”, coloríficos, sobremesas em pó, bebidas lácteas, misturas em pó, confeitos, bebidas isotônicas, polpas, sucos de frutas e em outras aplicações não alimentícias (cosméticas, farmacêuticas e têxteis) (FRANCO, 2003). O urucum é uma das principais matérias-primas para a produção de corantes naturais encontrada no país. Entretanto, sua industrialização requer conhecimento tecnológico para permitir a obtenção de corantes a baixo custo, a rendimentos maiores, com qualidade aceitável e capazes de competir nos mercados nacional e internacional.

Em relação ao comércio de urucum, a médio e longo prazos não é aconselhável a exportação da matéria-prima *in natura* (sementes de urucum), em vez do produto industrializado. São muitas as vantagens do corante processado, principalmente na forma de pó, tais como facilidade de manuseio, transporte, estocagem e versatilidade de produtos em que se pode ser aplicado, como por exemplo, em alimentos líquidos e em pó, e em produtos que requerem maior concentração do pigmento.

Com isso, o desenvolvimento de novas tecnologias de produção de corantes de urucum assume importância notória. Logo, são demandadas pesquisas para que os novos corantes produzidos possam atender às exigências do mercado interno e externo. O incremento de tecnologias eficazes de processamento e o crescente conhecimento na química e bioquímica dos pigmentos do urucum, e de seu comportamento em diferentes meios, poderiam contribuir significativamente na qualidade do produto final (corante), bem como no uso mais racional da matéria-prima (sementes).

Com base neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram:

- (i) determinar os melhores solventes na extração dos pigmentos do urucum;
- (ii) avaliar os métodos de produção de corantes em pó e em pasta;
- (iii) utilizar técnicas de isolamento dos pigmentos e
- (iv) analisar os fatores que influenciam na reação de saponificação da bixina, formando a norbixina, visando à otimização dos processos de produção dos pigmentos e à melhoria da qualidade destes.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Descrição e Classificação do Urucuzeiro

O urucuzeiro pertence à família Bixaceae e ao gênero *Bixa*. De acordo com FRANCO et al. (2002), sua classificação botânica é:

- Subdivisão: Angiosperma
- Classe: Dicotiledoneae
- Ordem: Parietales
- Sub-ordem: Cistianeae
- Família: Bixaceae
- Gênero: *Bixa*
- Espécies: *Bixa orellana* L. (tipo mais cultivado), *Bixa arborea*, *Bixa Americana*, *Bixa urucurana*, *Bixa purpurea*, *Bixa upatensis*, *Bixa tinetoria*, *Bixa oviedi*.

É uma árvore pequena, geralmente inferior a 6 metros, podendo atingir até 8 metros, com diâmetro na base do caule de 15 a 20 cm. A planta apresenta uma copa ampla, abundantemente ramificada. O tronco geralmente é reto e de casca lisa, íntegra, de coloração cinza-clara. As folhas são simples alternadas. São ricas em glândulas coloridas não visíveis a olho nu. As flores são grandes, ornamentais, hermafroditas, de coloração rósea e branca, de 3 a 5 cm de diâmetro. Os frutos são cápsulas ovóides (cachopas) achatadas, ovaladas, hemisféricas elipsóides ou cônicas, contendo numerosas sementes, rodeadas de uma polpa mole e vermelha.

As cápsulas abrem-se em duas partes iguais e sua cor varia desde castanho-escuro ou avermelhada até verde ou amarelo-pálido, de acordo com a variedade da planta. São densamente cobertos por espinhos flexíveis e contém, em média, 54 sementes que contém o pigmento (FRANCO et al., 2002).

As sementes podem ser numerosas por fruto. São angulares, com 3 a 4 mm de comprimento, cobertas com uma substância resinosa de coloração vermelho-alaranjada, a qual torna-se seca, dura e de coloração escura com o amadurecimento. A bixina é o pigmento presente em maior concentração nas sementes, representando mais de 80% dos carotenóides totais. As sementes do urucum também são ricas em proteínas, podendo ser empregadas na forragicultura, sendo utilizadas na composição de rações para aves, principalmente para as poedeiras. Sua utilização melhora a coloração das gemas dos ovos (FRANCO et al., 2002).

A floração da planta do urucum pode ser verificada durante todo o ano. Há um aumento acentuado na primavera e no verão. A frutificação também ocorre durante todo o ano, porém com aumento acentuado no inverno. A frutificação se inicia a partir do segundo ano e no terceiro ano a produção já é comercializável.

2. Os Pigmentos do Urucum

O urucum é um corante amarelo-vermelho obtido do pericarpo seco da semente madura da planta *Bixa orellana* L. (BAUTISTA et al., 2004). O corante responsável pela coloração do urucum apresenta-se convencionalmente de duas formas: a bixina, lipossolúvel, e a norbixina, que é hidrossolúvel (LIMA et al., 2001). Os corantes são encontrados recobrando a superfície externa das sementes de urucum e são constituídos na sua maioria (cerca de 80%) de *cis*-bixina.

O urucum é um corante natural muito usado em vários setores industriais. O baixo custo de produção e a baixa toxicidade fazem deste um pigmento muito atrativo e conveniente, em substituição a muitos corantes sintéticos (AGNER et al., 2004).

3. Estrutura Química dos Pigmentos do Urucum

O pigmento vermelho mais importante do urucum, a *cis*-bixina, também conhecida como α -bixina ou bixina lábil, é um éster monometílico do ácido carboxílico da *cis*-norbixina, que tem nove ligações olefínicas conjugadas, uma das quais tendo a configuração *cis* (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988; TOLEDO et al., 2004;).

Historicamente, a bixina foi o primeiro carotenóide em que o isomerismo geométrico foi encontrado. Os corantes bixina e norbixina apresentam duas configurações estereoquímicas, isto é, *cis* e *trans*. Nos extratos em condições normais pode predominar a *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina, mais instáveis. A *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina em solução sob aquecimento são parcialmente transformadas para a configuração *trans*, mais estável, conhecidas como isobixina e isonorbixina (PIMENTEL, 1995).

A bixina e a norbixina são uma particularidade dentre os carotenóides devido à sua molécula conter dois grupamentos fortemente polares. A maioria dos carotenóides na natureza tem a configuração *trans*. A bixina é uma exceção, sendo um carotenóide encontrado naturalmente na forma *cis*.

A bixina é única entre os carotenóides que ocorrem na natureza, não apenas devido à sua configuração *cis*, mas também devido à sua molécula ter dois grupos carboxílicos, um deles sendo um éster metílico. Isto dá à molécula certa lipossolubilidade. Pela hidrólise alcalina do seu grupamento éster metílico, pode-se preparar o sal hidrossolúvel do ácido dicarboxílico norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$). Ou seja, da bixina são obtidos os demais pigmentos do urucum, como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e os produtos de degradação térmica, que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável. Deve-se ressaltar que o corante hidrossolúvel do urucum é o sal da norbixina, que pode ser convertido em norbixina pela precipitação ácida e, nesta forma, o pigmento não é solúvel em água. Na Figura 1 estão resumidos os três tipos principais de pigmentos do urucum.

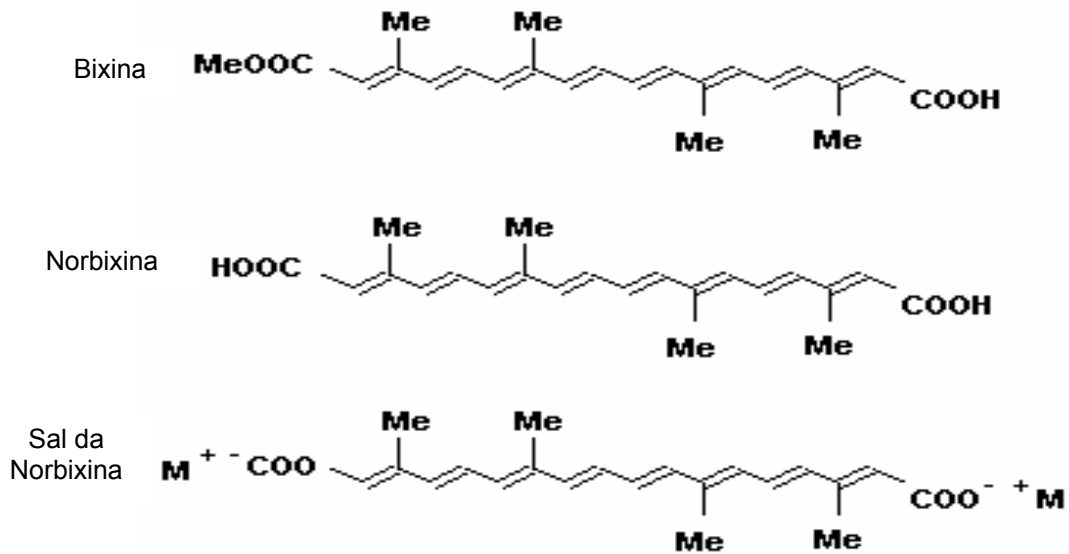


Figura 1: Fórmulas estruturais da bixina, da norbixina e do seu sal ($\text{M}^+ = \text{Na}^+$ ou K^+).

Fonte: Adaptado de PIMENTEL (1995).

A *cis*-bixina é sensível à luz e há estudos mostrando que é instável à temperatura ambiente, mesmo quando armazenada no escuro, tanto na forma em pó, quanto em uma solução de clorofórmio (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988). Com o aquecimento, a *cis*-bixina é convertida à forma mais estável e mais solúvel, *trans*-bixina (HENRY, 1996). A Figura 2 apresenta a relação entre os tipos de pigmentos do urucum.

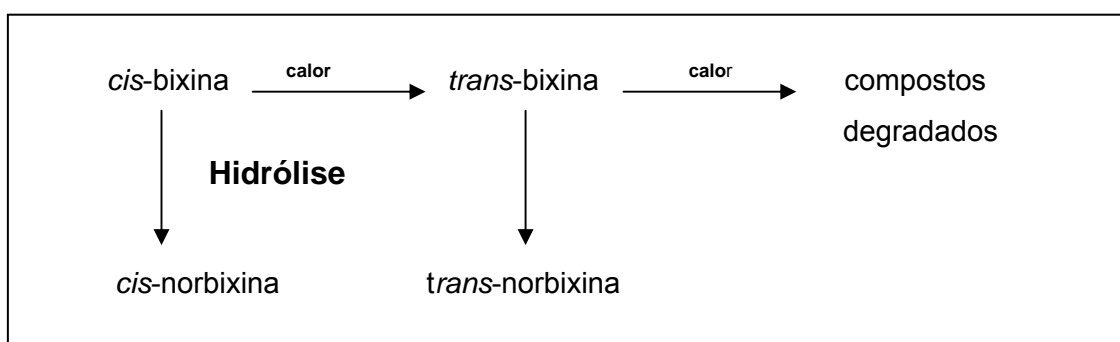


Figura 2: Inter-relação entre os diferentes pigmentos do urucum.

Fonte: HENRY (1996).

O cromóforo da bixina é o sistema de duplas ligações conjugadas, as quais conferem sua coloração particular (FRANCIS, 1996). No entanto, esta série de duplas ligações conjugadas é também a origem da

sensibilidade da bixina aos danos causados pelo oxigênio, luz e temperatura (NAJAR et al., 1988).

Outros carotenóides, em quantidades muito pequenas, já foram isolados das sementes de urucum e suas estruturas foram reveladas utilizando técnicas como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (MERCADANTE et al., 1996; 1997; 1999). Segundo MERCADANTE e PFANDER (2001), os novos carotenóides puderam ser divididos em três grupos: (a) ésteres metílicos de apocarotenóides (C_{30} e C_{32}); (b) diapocarotenóides com grupos terminais éster metílico, cetona e aldeído (C_{19} , C_{22} , C_{24} , e C_{25}); e (c) ácidos de diapocarotenóides (C_{22} e C_{24}) esterificados com grupos metil e geranylgeraniol.

MERCADANTE et al. (1996) relatam trabalhos em que outros carotenóides foram detectados em traços em sementes de urucum, como β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e metil bixina, incluindo a presença de carotenóides C_{40} . Apesar de a bixina ser o único componente de *Bixa orellana* que apresenta importância comercial, a planta possui vários compostos exóticos, como o geranylgeraniol. Alguns destes compostos não são encontrados em nenhuma outra planta, e muitos deles foram descobertos há menos de dez anos.

4. Extração dos Pigmentos do Urucum

Os métodos de extração utilizados para a produção de corantes de urucum a partir da semente podem envolver a produção de bixina ou, através da hidrólise aquosa, extração simultânea da norbixina.

Em escala comercial, três métodos básicos são usados para extrair o pigmento das sementes: a) extração alcalina, que resulta na conversão do carotenóide de uma forma de éster monometílico lipossolúvel a hidrossolúvel, ou seja, sal de norbixina; b) extração em óleo, que resulta na remoção da bixina das sementes além de pequenas quantidades de outros materiais coloridos, e; c) extração com solvente, que resulta na forma mais pura do pigmento bixina (PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992). Entretanto, os principais métodos de extração conhecidos serão detalhados a seguir.

4.1. Atrito e Secagem em Leito de Jorro

É um método de extração a seco muito utilizado atualmente. Usa equipamento em que as sementes de urucum são forçadas por uma corrente de ar através de um tubo em um extrator de leito de jorro. O impacto da partícula solta a camada superficial da semente e obtém-se bixina em pó com bom rendimento.

PASSOS et al. (1998) demonstraram a facilidade da extração da bixina das sementes de urucum pelo atrito entre as próprias partículas e pelo impacto entre elas. Para isso, foi utilizada uma unidade de leito de jorro para realizar tanto a secagem da semente quanto a extração de bixina pelo atrito entre as sementes. Segundo os autores, a unidade de leito de jorro foi um equipamento eficiente para extrair a bixina, obtendo-se um pó com partículas finas e baixo conteúdo de umidade final, o que são características desejáveis para a comercialização. É um equipamento apropriado para processar tanto a secagem da semente de urucum quanto a extração da bixina das sementes a baixos custos operacionais.

4.2. Raspagem e Peneiramento

São métodos rudimentares de obtenção dos corantes de urucum que proporcionam baixo rendimento, não sendo utilizados em escala industrial. A raspagem pode ser feita com escovas de náilon, na superfície externa das sementes. O peneiramento é feito proporcionando-se agitação às sementes em uma peneira, de forma que a camada externa das sementes de urucum se desprendam e sejam separadas, originando uma “massa” corante (FRANCO et al., 2002).

É importante ressaltar que o processo de extração do corante da semente de urucum é um processo relativamente fácil. Como a bixina está localizada no pericarpo (camada externa) das sementes, trabalha-se com os grãos inteiros, não havendo necessidade de trituração, o que favorece a pureza dos extratos e a separação dos extratos e das sementes esgotadas.

4.3. Lixiviação das Sementes com Água e Agitação

Este é o mais antigo método de extração industrial, ainda amplamente utilizado pelos índios (FRANCO et al., 2002). Envolve a abrasão mecânica, que é fornecida pela agitação da semente de urucum em água, que desaloja e separa a camada de pigmento. É obtida então uma suspensão corante, que pode ser filtrada ou centrifugada, e é submetida à secagem, originando uma pasta com um conteúdo de bixina de cerca de 20% (LEVY e RIVADENEIRA, 2000).

Para uso como corante alimentício a pasta pode ser dissolvida em óleo vegetal, no preparo de soluções diluídas de bixina, ou pode ser misturada com um álcali em meio aquoso para hidrolisar a bixina e obter soluções diluídas de norbixina.

Trata-se de um método rápido e de baixo custo, porém o corante de urucum extraído com água normalmente apresenta grande concentração de impurezas provenientes das sementes, que, juntamente com a bixina, são arrastadas (PÓVOA, 1992).

SOUZA (2000) avaliou a extração de pigmentos das sementes de urucum utilizando as sementes moídas e água. O material foi separado das sementes e liofilizado, e o teor médio de bixina encontrado nos corantes produzidos variou de 31 a 46%.

4.4. Extração com CO₂ Supercrítico

No processo de extração supercrítica é utilizado um solvente que se encontra em uma condição crítica de temperatura e pressão, e ocorre um aumento drástico na solubilidade de certos compostos neste solvente sob tais condições. Com isso, a extração com fluidos supercríticos é uma técnica atrativa para a remoção de compostos de maneira seletiva de sistemas alimentícios complexos. Tais compostos seriam de difícil remoção se utilizados os métodos convencionais (CHAO et al., 1991; PESSOA et al., 2006).

CHAO et al. (1991) investigaram a viabilidade técnica da extração de pigmentos de urucum sem degradação térmica utilizando CO₂ supercrítico

sob várias condições extratoras. A técnica utilizada extraiu a bixina das sementes de urucum sem pré-tratamento das sementes e sob condições de temperatura moderadas. Obteve-se elevada pureza dos extratos e alto rendimento de extração.

Os processos de extração supercrítica se destacam atualmente pela utilização de uma tecnologia que não deixa resíduos, pelo trabalho com solventes não tóxicos, pela não alteração das propriedades das matérias-primas e pela obtenção de produtos de alta qualidade (ARAÚJO, 1999; PESSOA et al., 2006). Contudo, é uma tecnologia de alto custo, não sendo utilizada em escala industrial.

4.5. Extração com Óleos Vegetais

Na culinária tradicional da América Latina, as sementes de urucum são aquecidas com óleo vegetal, separadas, e o óleo colorido é usado para o preparo de arroz e sopas, dentre outros pratos.

Um sistema similar de extração direta é aplicado industrialmente pela imersão da semente em óleo vegetal comestível refinado para produzir uma solução oleosa de bixina, que é então aquecida e filtrada. O filtrado é comercializado como corante para alimentos com elevado teor de lipídios. O extrato normalmente contém aproximadamente 1,5% de bixina, ou em alguns casos, suspensões oleosas com até 8% de bixina são comercializadas diretamente como corante de urucum óleo-solúvel após a padronização da cor. O pigmento principal obtido neste método de extração é a bixina, apesar de haver a formação de compostos de degradação térmica, que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável, devido ao uso de calor durante o processo.

O corante de urucum óleo-solúvel apresenta coloração do amarelo ao vermelho-laranja. Com o aquecimento da bixina, são formados os produtos de degradação de cor amarela. A intensidade e concentração destes compostos dependerá do binômio tempo/temperatura utilizados no processo de extração.

Comercialmente, a extração da 9'-*cis*-bixina pode se dar pelo aquecimento da suspensão de sementes em óleo vegetal a uma

temperatura máxima de 130 °C. Nestas condições, a 9'-*cis*-bixina sofre isomerização e é convertida aos seus isômeros *trans*, produzindo soluções oleosas compreendendo uma mistura de todos os isômeros *trans* da bixina e da 9'-*cis*-bixina em proporções variáveis, dependendo da temperatura de extração e do tempo. Próximo a estas altas temperaturas de extração, a 9'-*cis*-bixina sofre uma série de reações de degradação que produzem uma gama de produtos coloridos, que vão desde o amarelo até o alaranjado (PRESTON e RICKARD, 1980).

PÓVOA (1992) extraiu o corante de urucum utilizando os solventes etanol a 95%, água, óleo de soja e KOH 0,5%, de forma comparativa. Na extração com óleo de soja, utilizou a temperatura de 70 °C e o tempo de uma hora de extração. O extrato oleoso obtido apresentou-se como o corante mais puro dentre os demais, sendo constituído em cerca de 90% por apenas pigmentos e óleo.

SOUZA (2000) relatou que o pigmento de urucum pode ser obtido mecanicamente pela abrasão do pericarpo da semente submersa em óleo vegetal aquecido a 70 °C, com o produto comercial contendo de 0,2 a 0,25% de bixina.

Ainda, através da extração com óleos vegetais, pode ser produzido o colorau ou colorífico que, segundo a Resolução CNNPA 12/78 do Ministério da Saúde, é definido como um produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com urucum em pó ou com extrato oleoso de urucum adicionado ou não de sal e de óleos comestíveis. Este produto, em sua maioria destinado ao uso doméstico, proporciona cor avermelhada ao arroz, risotos, bifes, frangos, farofas, molhos e queijos. Seu principal mercado é a região Nordeste do Brasil (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

4.6. Extração com Solvente

Para a produção de uma formulação de urucum dispersível em água, pode ser utilizado o solvente propilenoglicol. Esta formulação consiste em uma suspensão de pigmentos de urucum em propilenoglicol, contendo um emulsificante. O extrato contém *cis*-bixina como pigmento vermelho predominante, e vários produtos podem ser derivados desta extração. Por

exemplo, após a remoção do solvente, o extrato pode ser diluído com óleo vegetal, produzindo uma formulação lipossolúvel. Alternativamente, o extrato pode ser purificado por cristalizações sucessivas – um processo que pode produzir bixina com elevado grau de pureza, de acima de 90% (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988).

O pigmento de urucum também pode ser extraído com um solvente apropriado tal como acetona. Os extratos podem ser lavados com hexano ou algum outro solvente em que o pigmento seja virtualmente insolúvel para remover impurezas e odores indesejáveis. Os solventes incluem acetona, diclorometano, dicloroetano, etanol, éter de petróleo e propano-2-ol. Os carotenóides presentes são *cis* e *trans*-bixina (PRESTON e RICKARD, 1980).

MONGE (1967) realizou a extração da bixina das sementes de urucum *in natura* utilizando clorofórmio a 40 °C, com forte agitação. Após filtração e concentração a vácuo, obteve cristais de cor violeta. Obteve também um extrato que é uma mistura dos outros corantes derivados do urucum, de cor vermelho-escura, denominado “pasta corante”, com 26,3% dos pigmentos totais referentes à bixina.

A extração com solventes orgânicos é limitada pela necessidade de um solvente que seja compatível com o emprego do produto final. Em produtos alimentícios, o corante estará sujeito a sérias restrições técnicas, pela toxicidade potencial de resíduos de solventes neles presentes. Esse fato vem diminuindo a utilização desse processo na produção do corante. De acordo com a Resolução CNNPA nº 44 (BRASIL, 2007), os solventes autorizados que devem ser usados na elaboração e processamento de corantes são: água, açúcares, álcool etílico, amidos, cloreto de sódio, dextrina, gelatina, glicerol, óleos e gorduras comestíveis. Portanto, apesar de a extração dos pigmentos das sementes de urucum utilizando solventes orgânicos ser a mais eficiente em termos do teor de pigmentos extraídos e da pureza do extrato, não é muito utilizada em escala industrial, devido à possível presença de resíduos de solventes no produto processado. Entretanto, para ensaios laboratoriais como determinação do teor de bixina em sementes e extratos, isolamento de bixina, dentre outros, os solventes orgânicos são os mais adequados.

Um solvente orgânico utilizado em indústrias processadoras de urucum é o etanol, pela facilidade de sua obtenção e baixo custo no Brasil, comparado a outros solventes. Outras características favoráveis são: disponibilidade, baixa toxicidade, baixo ponto de ebulição e propriedades bactericidas (PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992).

SOUZA (2000) estudou a extração de pigmentos de urucum utilizando sementes e etanol na proporção de 1:2 (p/v), durante duas horas. Os corantes concentrados produzidos apresentaram um teor de bixina de cerca de 70 a 72%. ALVES et al. (2006) também estudaram a extração de pigmentos de urucum utilizando etanol como solvente, variando o tempo de extração entre quinze minutos, trinta minutos e duas horas. Comparando-se o tempo de extração e agitação do processo, verificou-se um aumento de 1,6 vezes no rendimento da extração de duas horas, que foi de 79,18%, em relação à extração de 15 minutos, cujo rendimento foi de 50,41%.

4.7. Extração com Soluções Alcalinas

O processo mais simples e mais utilizado comercialmente para a produção de corantes de urucum é o que utiliza soluções alcalinas para extrair o pigmento. Reside no fato de que o pigmento (a bixina) não é solúvel em água, exceto em uma solução alcalina, onde pode ser saponificada. Tanto o hidróxido de sódio, de potássio ou de amônio e o carbonato de sódio são utilizados como o álcali.

Estudos de WOOD et al. (1991) explicaram que, na extração e no processamento do pigmento de urucum, vários produtos de rearranjo ou degradação podem ser formados. Uma cuidadosa hidrólise alcalina da bixina forma o ácido dicarboxílico livre, a norbixina, que, da mesma forma que a bixina, pode existir em ambas as formas *cis* e *trans*. Todos esses compostos têm valor como corante para alimentos e podem estar presentes num extrato ou em uma formulação de urucum, dependendo de como tenha sido preparado. Isso poderá determinar os produtos alimentícios em que o corante poderá ser utilizado.

Conforme mostrado anteriormente, a bixina é um éster monometílico de um ácido dicarboxílico e, em condições alcalinas, o grupo metil pode ser

saponificado, produzindo o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina. Em excesso de álcali, o ácido dicarboxílico dissocia-se para formar um sal, geralmente de potássio ou sódio, sendo esta forma de pigmento solúvel em água. Para aplicações em produtos aquosos esta é a forma de pigmento normalmente empregada (COLLINS, 1992; PIMENTEL, 1995). Ou seja, na extração dos pigmentos das sementes de urucum com solução aquosa alcalina em condições controladas, tem-se a hidrólise do grupamento éster do principal carotenóide bixina, dando origem ao sal de norbixina (norbixinato), solúvel no meio.

No entanto, dificuldades podem surgir quando o meio é ácido, o que é o mais comum em sistemas alimentícios, onde o norbixinato é reprotonado, formando a norbixina, que é um ácido dicarboxílico insolúvel em água, precipitando o pigmento (PIMENTEL e STRINGHETA, 1999b). Para prevenir isto, um emulsificante pode ser usado e, dependendo do emulsificante e do método de produção, um extrato hidrossolúvel mais estável pode ser formado, mesmo para pH em torno de 2. A Figura 3 mostra as reações químicas envolvidas na produção do corante de urucum utilizando-se soluções alcalinas.

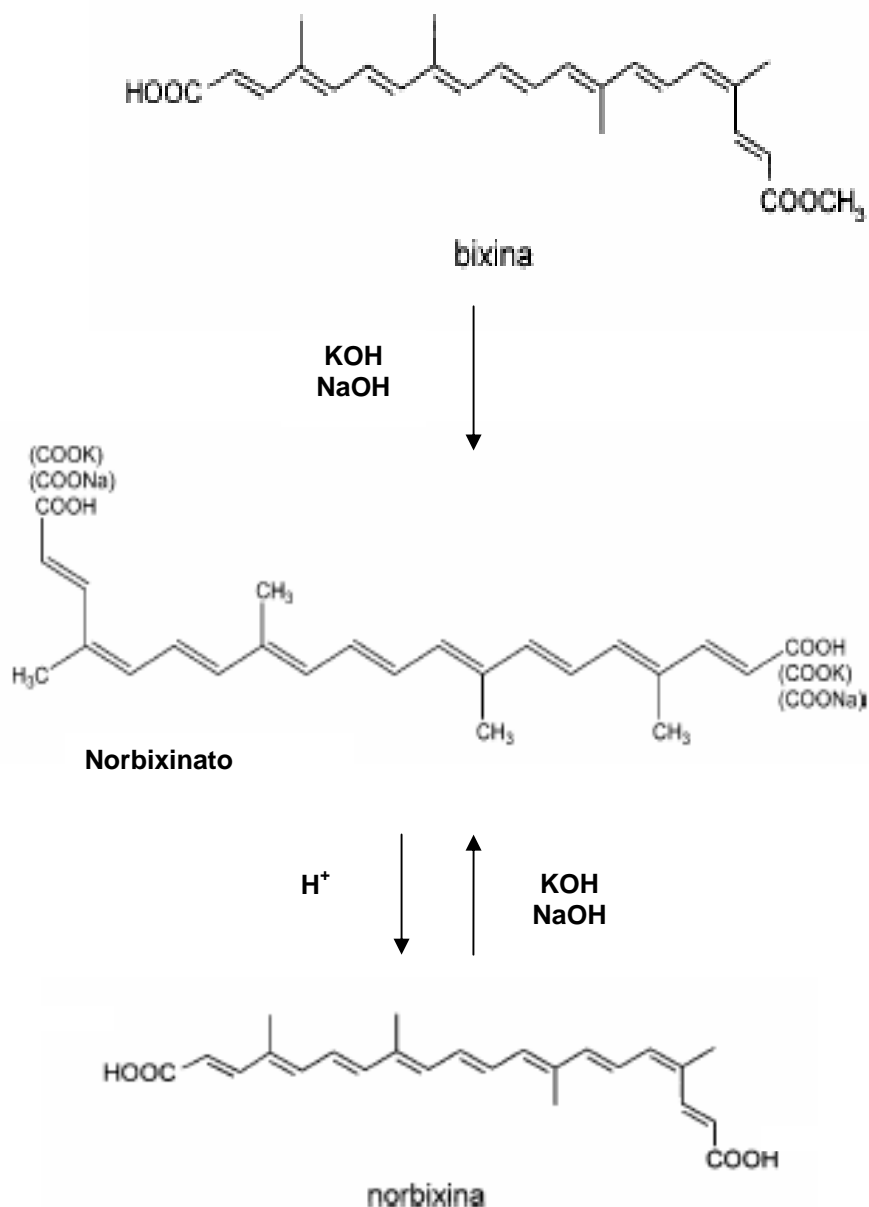


Figura 3: Reações químicas para obtenção do corante (norbixina) de urucum utilizando soluções alcalinas.

SHUHAMA et al. (2003) propuseram um novo método para a produção de corante de urucum em pó baseado na extração alcalina das sementes e na posterior secagem do extrato em um secador de leite de jorro contendo partículas inertes. Este secador se destacou pelo seu baixo custo e elevada produtividade. Foi possível obter um corante em pó contendo elevado teor de pigmento. Entretanto, em temperaturas superiores a 80 °C houve um decréscimo brusco do teor de pigmento, indicando degradação.

Ainda, sugeriu-se que o processo poderia não somente ser utilizado em escala industrial na preparação de pigmentos de urucum, como também em fazendas produtoras de urucum, em pequena escala, de forma que os produtores de urucum possam comercializar um pó com elevado teor de corante, ao invés da matéria-prima *in natura*.

BATISTA (1994) analisou a extração dos pigmentos do urucum utilizando solução de hidróxido de sódio em diferentes concentrações e a diferentes proporções de massa de semente/volume de solução. Os resultados obtidos mostraram que a concentração da base que permitiu o mais alto rendimento de extração foi a de NaOH 0,1 N, que possibilitou um teor de norbixina nos extratos de cerca de 1,3%. RUIZ e WOOD (1971) também obtiveram rendimento máximo na extração dos pigmentos de urucum quando utilizaram solução de NaOH nesta concentração. Em relação à proporção entre a massa de grãos de urucum e o volume da solução extratora, selecionou-se a proporção de 1:6. A melhor proporção semente:solvente é aquela que, além de proporcionar maior rendimento de extração dos pigmentos dos grãos de urucum, utiliza menor volume de solução extratora, a fim de diminuir os custos de produção do corante.

PIMENTEL (1995) avaliou parâmetros da extração de pigmentos de sementes de urucum utilizando os solventes hidróxido de potássio e hidróxido de amônio. Dentre os parâmetros avaliados, estavam a relação entre a massa de sementes/volume de solvente e concentração dos álcalis utilizados. O autor avaliou nove concentrações das bases e para cada concentração estudada foram avaliadas diferentes relações entre massa de sementes e volume da solução. A melhor proporção de massa de sementes/volume de solvente encontrada foi a de 1/6 (m/v), concordando com os resultados obtidos por BATISTA (1994). As melhores concentrações encontradas foram de KOH 0,1 N e NH₄OH 0,52 N. Ainda, para a base hidróxido de amônio, foi avaliada a extração dos pigmentos de urucum utilizando-a, na concentração de 0,52 N, solubilizada em diferentes concentrações de álcool etílico comercial. Observou-se que a concentração de NH₄OH a 0,52 N em álcool a 58% foi a que mais removeu pigmentos das sementes de urucum, com seu extrato atingindo a concentração de norbixinato de 2,24%.

No tocante ao número de reextrações viáveis para a remoção de pigmentos das sementes de urucum, BATISTA (1994) realizou dez extrações sucessivas de sementes de urucum utilizando o solvente NaOH 0,1 N na proporção semente:solvente de 1:6 (p/v). Verificou-se que 91,3% do pigmento total da semente foi extraído na primeira extração. PIMENTEL (1995), de forma semelhante, realizou dez extrações sucessivas utilizando os solventes KOH 0,1 N e NH₄OH 0,52 N em etanol a 58%. Os resultados revelaram que 81,02% do total de pigmentos foram removidos na primeira etapa de extração com o solvente KOH 0,1 N e 86,99% dos pigmentos com o NH₄OH 0,52 N em etanol a 58%.

PÓVOA (1992) avaliou a extração de corantes de urucum utilizando diversos solventes, dentre eles o hidróxido de potássio a 0,5%, analisando-se o teor de pigmentos na semente antes e após a extração com os solventes. A utilização do KOH 0,5% possibilitou a extração de, aproximadamente, 98% dos pigmentos da semente.

Segundo REDDY (1976), o método mais eficiente e econômico de extração para a obtenção do corante de urucum é a lixiviação com solução alcalina, seguida de neutralização (pH) e precipitação ácida do extrato. Nesse método, a extração é realizada a quente com carbonato de sódio e, após a filtração, o extrato é centrifugado para a remoção dos sobrenadantes. Outro método para a obtenção de norbixina consiste na agitação das sementes em meio alcalino (NaOH a 2%), seguida do ajuste do pH para 1,8 com HCl. Após a precipitação e centrifugação dos extratos de urucum, o pigmento é lavado e centrifugado novamente (BHALKAR e DUBASH, 1983).

Segundo PIMENTEL (1995), além de seu emprego para a produção de extratos na forma de pasta ou pó, a precipitação ácida tem sido utilizada para a purificação de corantes. Esse autor produziu corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir das soluções extratoras KOH 0,1 N e NH₄OH 0,52 N em etanol a 58%. Após a etapa de extração, adicionou-se ácido cítrico 2 N até que o pH do extrato de urucum abaixasse até valores próximos a 4. O precipitado foi, então, seco em estufa a vácuo à temperatura de 55 °C. Os teores de norbixina obtidos nos corantes em pó foram de 22,57% para corante obtido com a solução de hidróxido de amônio e de 8,55% para o corante obtido com a solução de hidróxido de potássio.

A Figura 4 mostra as reações químicas que ocorrem na obtenção do corante (bixina/norbixina) de urucum, por precipitação ácida, utilizando-se a solução alcoólica de NH_4OH . Reações semelhantes podem ocorrer se forem utilizados outros álcalis, como o KOH 0,1 N, por exemplo, que realizem a saponificação parcial da bixina em norbixina, gerando uma mistura de pigmentos no corante concentrado produzido.

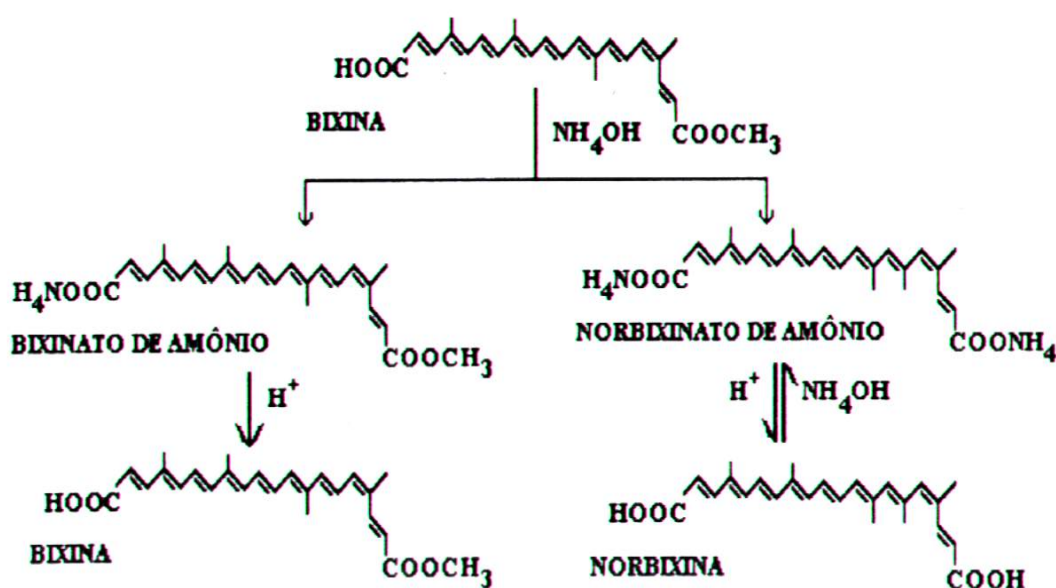


Figura 4: Reações químicas para a obtenção do corante (bixina/norbixina) de urucum, utilizando NH_4OH .
Fonte: PIMENTEL (1995).

A indústria tem usado o extrato seco de urucum hidrossolúvel em vez do corante na forma líquida. De forma geral, os pigmentos em pó têm sido preferidos pela indústria por apresentarem alta intensidade de cor, fácil manuseio e transporte e maior estabilidade durante a estocagem, além de serem úteis em produtos secos como em sopas desidratadas e misturas em pó. A produção industrial de corantes em pó vem se desenvolvendo em larga escala, em equipamentos do tipo “spray-dryer”, em razão da sua eficiência de secagem em pouco tempo. A sua eficiência em rendimento de secagem e o reduzido efeito sobre a qualidade dos produtos sensíveis ao calor são características que favorecem a indicação desta técnica como viável para a conservação de corantes naturais (PIMENTEL, 1995).

A secagem utilizando o equipamento “spray-dryer” se baseia na atomização ou pulverização da matéria-prima a ser desidratada em partículas diminutas, que caem dentro de uma câmara especial sob ação do ar a temperaturas elevadas, o que produz a evaporação da água presente no produto. O grande aumento da superfície de contato dado pela pulverização ou atomização possibilita a evaporação da parte líquida em questão de segundos, impedindo que o produto sofra alterações. Este processo oferece condições de controle sobre a densidade do produto, sua capacidade de reconstituição, taxa de escoamento, temperatura e umidade do ar de secagem. O teor de umidade do produto final dependerá da taxa de evaporação e do teor de umidade inicial do extrato (PIMENTEL, 1995).

Segundo BATISTA (1994), tem-se produzido extratos hidrossolúveis de urucum em pó por meio de secagem em equipamento “spray-dryer”. Neste processo, os corantes obtidos em meios alcalinos de hidróxido de sódio ou de hidróxido de potássio tiveram, respectivamente, perdas de 27 e 31% de norbixinato, em razão da decomposição e retenção do pigmento nas paredes do equipamento. PIMENTEL (1995) avaliou o efeito do processo de secagem utilizando “spray-dryer” sobre o norbixinato de potássio a partir de extratos de urucum pré-concentrados com maltodextrina e aquecimento a vácuo em evaporador rotatório. As melhores relações entre as perdas de norbixinato e rendimento de secagem foram obtidas nos extratos pré-concentrados com maltodextrina até atingirem 16,5% de sólidos totais, apresentando perda de apenas 0,79%. Com base nestes resultados, recomendou-se o uso da maltodextrina na pré-concentração dos extratos de urucum para secagem em “spray-dryer”.

5. Análise dos Pigmentos

5.1. Colorimetria

A sensação de cor é produzida pela combinação de três fatores: fonte de luz, tipo de objeto e observador. A mudança de um destes fatores irá alterar a forma de se perceber a cor de um objeto qualquer. Ainda, deve-se levar em consideração que a maneira como duas pessoas percebem a

cor de certo objeto nem sempre é a mesma. Esta distinção individual da cor é algo inerente ao ser humano. No entanto, experiências e preferências pessoais nem sempre se adequam às necessidades das indústrias para quantificação deste atributo. Neste caso, é necessária uma linguagem universal para discutir a cor e as suas variações. Esta linguagem comum é fornecida pelos instrumentos de análise de cor, usando-se escalas conhecidas e aceitas internacionalmente. Nestes sistemas, a cor é alocada em um sólido de cor tridimensional, onde é quantificada (PONTES, 2004).

Hunter desenvolveu um colorímetro fotoelétrico triestímulo que ganhou bastante aceitação na indústria de alimentos, baseando-se na representação numérica da visão tridimensional do homem. Neste equipamento, a coordenada “L” (luminosidade) de Hunter expressa o grau de claridade da cor. A coordenada “a” é mensurável em termos de intensidade de vermelho e verde, e a coordenada “b” está relacionada com a intensidade de amarelo e azul. A Figura 5 mostra um sólido de Hunter. As coordenadas “a” e “b” juntas podem gerar parâmetros relacionados à tonalidade, que caracteriza a qualidade da cor e está relacionada a um comprimento de onda específico, e à saturação (croma), que caracteriza a quantidade da cor (PONTES, 2004). As equações a seguir mostram as relações entre as coordenadas:

$$h = \arctan(b / a)$$

$$c = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Em que:

- “c” é a saturação da cor ;
- “h” é a tonalidade da cor.

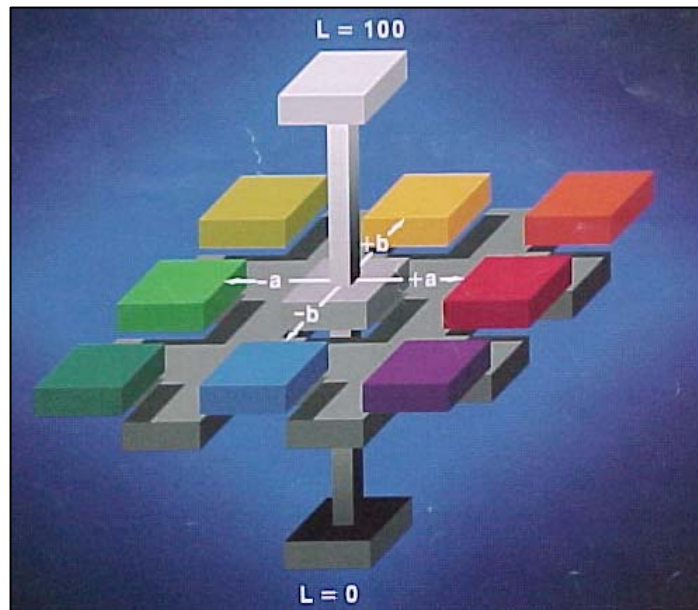


Figura 5: Sólido de Hunter.
Fonte: PONTES, 2004.

5.2. Métodos Espectrofotométricos

5.2.1. Nas Sementes de Urucum

Um exame preciso de todo o espectro visível nos fornece informações importantes acerca da composição qualitativa de extratos de urucum e de corantes em alimentos de forma geral. Em espectrofotometria, os carotenóides normalmente mostram três picos de absorção máxima. Estes picos são numerados I, II e III, partindo do mais baixo comprimento de onda em direção ao mais alto (Figura 6).

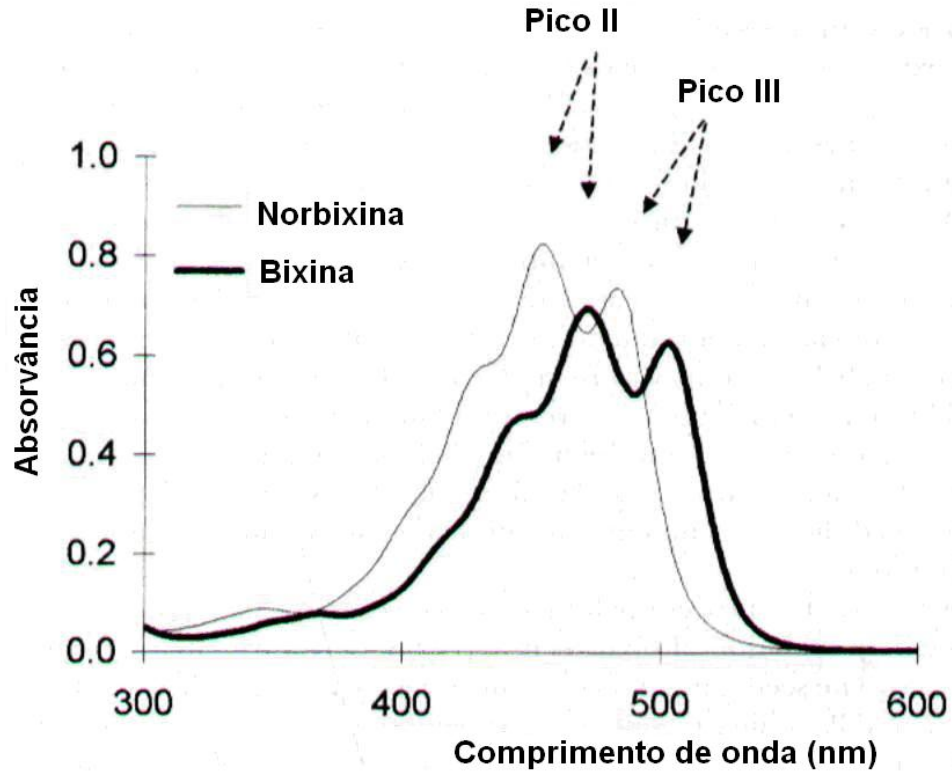


Figura 6: Curvas espectrofotométricas da bixina e da norbixina.
Fonte: LEVY e RIVADENEIRA (2000).

As medidas da absorvância nos picos II ou III são usadas para determinação quantitativa da bixina e da norbixina, apesar do pico III ser geralmente o preferido, devido ao fato de que, neste comprimento de onda, há menos interferência da possível presença de produtos de decomposição amarelos, que ficam sobrepostos na curva espectral, o que poderia requerer a aplicação de um fator de correção (LEVY e RIVADENEIRA, 2000).

Os solventes usuais para extração analítica dos pigmentos das sementes de urucum são clorofórmio, acetona, etanol e metanol, bem como misturas de clorofórmio com acetona, clorofórmio com etanol e clorofórmio com metanol. As vantagens destes solventes orgânicos são a facilidade de sua recuperação e reutilização por destilação, bem como a ótima eficiência de extração (LEVY e RIVADENEIRA, 2000).

Um procedimento alternativo muito utilizado para determinações rotineiras do teor de pigmentos de sementes de urucum é a determinação da bixina convertida em seu derivado, a norbixina, através de uma reação de saponificação. Para tal, a amostra é aquecida em solução aquosa de

hidróxido de potássio. Para a subsequente medida espectrofotométrica da concentração de pigmento na amostra, são utilizados fatores de correção para que o resultado possa ser expresso em termos de concentração de bixina (STRINGHETA et al., 1999; LEVY e RIVADENEIRA, 2000). São muitas as vantagens de se utilizar o método do KOH e suas variações na determinação de bixina em sementes de urucum. Dentre elas, pode-se citar a facilidade de aquisição desse solvente extrator, seu baixo custo operacional e grande rigidez no teor final de bixina, além de ser um método aceito internacionalmente (FRANCO et al., 2002).

5.2.2. Em Extratos e em Formulações

5.2.2.1. Produtos em que há Predominância de Bixina

Em produtos nos quais o pigmento majoritário é a bixina, a quantificação pode ser feita utilizando-se os solventes acetona, clorofórmio e misturas de clorofórmio e ácido acético, amplamente mencionados na literatura.

SCOTTER et al. (1998) descrevem um método baseado em SMITH et al. (1983), em que foi determinada bixina em uma amostra de corante em pó, utilizando-se uma solução de 3,7% de ácido acético em clorofórmio (v/v). A absorvância da solução diluída foi medida a 505 e 474 nm, e o conteúdo de bixina foi determinado por intermédio dos coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.790 (505 nm) e 3.130 (474 nm). RODRIGUEZ-AMAYA (1988), para a determinação de bixina, recomendou a utilização da solução de clorofórmio contendo 4% de ácido acético. CHRISTIAN HANSEN (2000a) recomenda, para a determinação de bixina em suspensões de urucum lipossolúveis, o uso da acetona, com o teor de pigmento determinado medindo-se o valor da absorvância em aproximadamente 485 nm, utilizando-se o coeficiente de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 3.140.

A Tabela 1 sumariza os principais coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) utilizados na quantificação espectrofotométrica de bixina.

Tabela 1: Coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) e comprimentos de onda de máxima absorção de bixina em diferentes solventes.

Composto	Comprimento de onda de absorção máxima (nm)	Solvente	($A_{1\text{cm}}^{1\%}$)	Referência
Cis-bixina	470	Clorofórmio	3.230	REITH e GIELEN (1971)
			3.092	SCOTTER et al. (1994)
	474	Clorofórmio + 4% ác. acético	3.130	REITH e GIELEN (1971), SMITH (1983)
	485	Acetona	3.140	CHRISTIAN HANSEN (2000a)
	488	Metanol/ác. acético glacial 7:3 (v/v)	2.931	BARETH et al. (2002)
	501	Clorofórmio	2.826	McKEOWN e MARK (1962)
			2.880	REITH e GIELEN (1971)
			2.773	SCOTTER et al. (1994)
			2.870	LEVY e RIVADENEIRA (2000)
	505	Clorofórmio + 4% ác. acético	2.790	REITH e GIELEN (1971), SMITH (1983)
Trans-bixina	476	Clorofórmio	3.240	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)
	507	Clorofórmio	2.970	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA (1988) e LEVY e RIVADENEIRA (2000).

5.2.2.2. Produtos em que há Predominância de Norbixina

Em produtos nos quais o pigmento majoritário é a norbixina, há dois métodos que se destacam: o método que utiliza misturas de clorofórmio e ácido acético e o método que utiliza solução de hidróxido de potássio.

SCOTTER et al. (1998), na determinação de norbixina de corantes hidrossolúveis em pó, utilizou uma solução de 0,5% de ácido acético em clorofórmio, medindo-se a absorvância a 503 nm e a 473 nm. O conteúdo de norbixina foi determinado por meio dos coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.290 (503 nm) e 2.620 (473 nm). Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1988), este método foi utilizado com sucesso para corantes de urucum em pó contendo principalmente norbixina (e nenhuma bixina detectável). CHRISTIAN HANSEN (2000b) recomendou, para a determinação de norbixina em produtos líquidos ou para corantes hidrossolúveis de urucum, o uso do solvente KOH 0,5%. Este método parte da premissa de que o pigmento de urucum hidrossolúvel, na forma comercial, é uma mistura de isômeros de norbixina. O teor de pigmento é determinado medindo-se a absorvância em aproximadamente 482 nm. O coeficiente de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) para *cis*-norbixina em KOH a 0,5% neste comprimento de onda é de 2.870.

A Tabela 2 sumariza os principais coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) utilizados na quantificação de norbixina.

Tabela 2: Coeficientes de absorvidade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) e comprimentos de onda de máxima absorção da norbixina em diferentes solventes.

Composto	Comprimento de onda de absorção máxima (nm)	Solvente	($A_{1\text{cm}}^{1\%}$)	Referência	
Cis-norbixina	453	KOH 0,1 N	2.850	REITH e GIELEN (1971)	
			2.818	SCOTTER et al. (1994)	
			3.473	LEVY e RIVADENEIRA (2000)	
			NaOH 0,1 M	2.850	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)
	468	Clorofórmio	2.470	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)	
	473	Clorofórmio + 0,5% ác. acético	2.620	REITH e GIELEN (1971) SMITH (1983)	
	482	NaOH 0,1 M	2.550	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)	
		KOH 0,1 N	2.550	REITH e GIELEN (1971) SMITH (1983)	
			2.503	SCOTTER et al. (1994)	
			2.870	LEVY E RIVADENEIRA (2000)	
		KOH 0,5%	2.870	CHRISTIAN HANSEN (2000b)	
	488	Metanol/ác. acético glacial (7:3)	2.931	BARETH et al. (2002)	
	499	Clorofórmio	2.200	RODRIGUEZ-AMAYA (1988)	
503	Clorofórmio + 0,5% ác. acético	2.290	REITH e GIELEN (1971) SMITH (1983)		

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA (1988) e LEVY e RIVADENEIRA (2000).

5.3. Métodos Cromatográficos

5.3.1. Cromatografia em Camada Delgada e em Coluna

Os métodos cromatográficos em placas (camada delgada) e em coluna foram muito empregados no passado, quando técnicas cromatográficas mais avançadas ainda não se encontravam disponíveis, para a separação e mesmo identificação dos pigmentos individuais de um dado extrato. Ainda hoje, esses métodos são utilizados em escala preparativa, na separação de um dado composto de interesse, e também para identificação de compostos, baseados em padrões e em seus fatores de retenção (R_f).

REITH E GIELEN (1971) utilizaram cromatografia em camada delgada para a análise dos corantes em manteiga e queijo. Para tal, os autores empregaram placas cobertas com celulose como fase estacionária, e uma mistura de ciclohexano/clorofórmio/ácido acético (65:5:1) como fase móvel. O tempo de desenvolvimento foi superior a duas horas. Para soluções oleosas de urucum, parte da bixina se encontrou complexada com produtos de degradação de coloração amarela. Para os corantes de queijo, foram utilizadas placas de sílica-gel como fase estacionária e uma mistura de clorofórmio:etanol:ácido acético (68:2:1) como fase móvel. O tempo de desenvolvimento foi de cerca de três horas. Para a quantificação das frações dos pigmentos separados, as bandas relativas a cada pigmento foram raspadas, eluídas e quantificadas por meio de espectrofotometria.

DENDY (1966) utilizou placas de sílica e uma mistura de clorofórmio/acetona/ácido acético (50:50:1), e obteve boa separação dos compostos com um tempo de desenvolvimento de cerca de 30 minutos.

OLIVEIRA (2005) cita um método de isolamento e a purificação da bixina em coluna preparativa empregando fase reversa C_{18} . Após uma prévia purificação em coluna preparativa empacotada com sílica gel e empregando como fase móvel uma mistura contendo 25% de acetona e 75% de hexano foi possível eliminar os componentes minoritários. Posteriormente para isolamento da bixina, uma primeira eluição, com uma solução de acetonitrila/água 50%, permitiu a retenção da bixina e remoção da norbixina.

Por fim, percolando a coluna com uma solução 40:60, a bixina retida foi removida do adsorvente e isolada.

5.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os métodos cromatográficos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentam diversas vantagens em relação aos métodos cromatográficos de placa e de papel, no tocante ao tempo de análise (já que em alguns métodos a separação de compostos ocorre em cerca de quinze minutos), à precisão e à praticidade da análise de modo informatizado. Há vários métodos envolvendo o uso da cromatografia líquida na detecção e quantificação de pigmentos de urucum em matrizes alimentícias descritos na literatura. A maioria dos métodos é muito precisa, e possibilita inclusive a separação dos isômeros geométricos da bixina e da norbixina.

Uma característica interessante do uso de CLAE para corantes de urucum é a possibilidade de distinguir quais dos picos se referem ao corante de cor vermelha e quais se referem aos compostos amarelados, muitas vezes relacionados à degradação térmica, variando-se o comprimento de onda de detecção, ou utilizando-se um detector de arranjo de diodos (LEVY e RIVADENEIRA, 2000).

TOCCHINI e MERCADANTE (2001) determinaram, por CLAE, os teores de bixina e norbixina em coloríficos. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:ácido acético 2% (65:35). A fase estacionária utilizada foi coluna C₁₈. SCOTTER et al. (1994), ao utilizar as mesmas fases móvel e estacionária, separaram os carotenóides, incluindo isômeros, em 22 minutos. Os picos apresentaram-se simétricos, sem cauda e espectrofotometricamente puros. RIOS e MERCADANTE (2002) quantificaram por HPLC corantes de urucum em salgadinhos extrusados utilizando as mesmas condições cromatográficas anteriores, obtendo boa separação de compostos e precisão na quantificação dos corantes.

BARETH et al. (2002) desenvolveram um método rápido e simples para detecção do corante de urucum em queijos e outros produtos derivados de leite, utilizando CLAE. A separação ocorreu utilizando-se a mistura de

solventes acetonitrila:ácido acético 5% (75:25), e coluna C₁₈. Os isômeros *cis* e *trans*-norbixina e *cis* e *trans*-bixina foram todos separados em apenas dez minutos de análise, o que, sem dúvida, tornou este método vantajoso.

RODRIGUEZ-AMAYA (1988) avaliou vários métodos de CLAE para identificação e separação dos pigmentos de urucum, utilizando misturas de metanol:ácido acético como fase móvel em proporções variadas. A combinação que melhor obteve a separação foi de metanol: ácido acético 2% (82:18) como fase móvel. Foram investigados vários comprimentos de onda de detecção na faixa de 400 a 500 nm, e a sensibilidade mais elevada para bixina e norbixina foi encontrada a 470 nm. Entretanto, uma resposta adequada também foi obtida a 500 nm, e este último comprimento de onda pareceu apresentar menor interferência de compostos que absorvem em comprimentos de onda mais baixos. Entretanto, o tempo de separação apresentou-se como um inconveniente para este método, já que foi superior a trinta minutos.

SCOTTER et al. (1998), ao analisarem formulações diversas de corantes de urucum, utilizaram CLAE acoplada a detector de arranjo de diodos. A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila: ácido acético 0,4% (65:35). A fase estacionária foi uma coluna C₁₈. A detecção foi realizada a 460 nm para os isômeros da bixina e da norbixina e a 400 nm para os isômeros dos compostos de degradação térmica C₁₇. O tempo de separação foi de pouco mais de vinte minutos e o sistema mostrou-se eficiente. SCOTTER (1995) e SCOTTER et al. (2001) utilizaram as mesmas condições cromatográficas anteriores para caracterizar os compostos de degradação térmica da bixina proveniente do urucum.

LANCASTER e LAWRENCE (1996) desenvolveram um método de CLAE simples e confiável para separação de misturas de corantes, contendo ácido carmínico, *cis* e *trans*-bixina e *cis* e *trans*-norbixina. As fases móveis utilizadas foram: metanol:ácido acético 6% (40:60), como fase móvel A e metanol:ácido acético 6% (90:10), como fase móvel B, em sistema gradiente de 0 a 90% de fase móvel B durante 2 minutos, e depois mantidos os 90% de fase móvel B. Os autores verificaram a eficácia do método em sistemas alimentícios como bebidas a base de frutas, iogurte e doces.

Conforme pode ser visto, há diversas metodologias disponíveis envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência na detecção, separação e quantificação de pigmentos de urucum, bem como de outros corantes naturais. A escolha por um ou outro método deve ser feita tendo em foco o tipo de análise, o tempo disponível para cada análise e o custo de cada método. As técnicas de CLAE fornecem um valioso complemento para as análises espectrofotométricas, e a CLAE poderia, eventualmente, se tornar o principal método de quantificação de pigmentos, se padrões puros dos compostos de interesse fossem obtidos.

6. Estabilidade do Urucum

O longo sistema de duplas ligações conjugadas presente na estrutura de carotenóides, tais como bixina e norbixina, é o responsável pela coloração característica, mas também pela pobre estabilidade da molécula sob as condições de processamento e armazenamento, tais como temperaturas elevadas, luz e oxigênio (BARBOSA et al., 2005). Dependendo da estrutura, o carotenóide está sujeito a uma série de transformações, que vão desde a hidrogenação até a epoxidação e isomerismo *cis-trans*. Na forma *trans*, o carotenóide é mais estável e apresenta coloração mais intensa.

NAJAR et al. (1988) avaliaram os efeitos da luz, do ar, da ação de antioxidantes como palmitato de ascorbila e de pró-oxidantes como peróxido de benzoíla em extratos de urucum. Os resultados mostraram uma considerável estabilidade do urucum à oxidação pela ação do ar e uma resistência mais baixa aos efeitos da luz. A adição do antioxidante palmitato de ascorbila pareceu ser uma boa forma de se aumentar a durabilidade da cor quando submetido a forte iluminação. Em contrapartida, a presença de radicais livres ou algum promotor destas espécies nos extratos de urucum levou a uma perda rápida de cor. Os autores concluíram que a luz foi o agente mais destrutivo do pigmento, seguido pelo pró-oxidante peróxido de benzoíla.

PIMENTEL e STRINGHETA (1999a) estudaram a estabilidade dos extratos alcalinos de urucum em relação à presença e à ausência de luz e

oxigênio. Os autores concluíram que a luz foi o principal agente destrutivo do pigmento.

Comparada a outros carotenóides, a bixina e a norbixina apresentam maior estabilidade ao calor durante o processamento do alimento. Pelo aquecimento da bixina em óleo uma decomposição térmica parcial pode ser alcançada intencionalmente para proporcionar uma tonalidade amarelada mais pura para o produto (LEVY e RIVADENEIRA, 2000).

Em relação ao pH, a estabilidade é variável. Em valores de pH inferiores a 7, o pigmento precipita na forma de norbixina, devendo, assim, utilizar um emulsificante para melhorar a estabilidade do corante.

Em relação ao oxigênio, a norbixina e a bixina comportam-se de maneira semelhante, apresentando taxa de oxidação muito baixa.

GLÓRIA et al. (1995), ao avaliarem a influência da atividade de água na estabilidade da bixina em sistemas-modelo, estocados na presença ou ausência de luz e/ou de ar, verificaram que a bixina armazenada sob ar/escuro e nitrogênio/luz apresentou maior estabilidade a atividades de água intermediárias (0,75). Entretanto, sob nitrogênio/escuro e sob ar/luz, a maior estabilidade foi observada a atividades de água mais elevadas.

7. Aplicações e Benefícios

O corante de urucum é utilizado de várias formas, extensivamente na indústria de alimentos, particularmente em derivados de leite e carne. O êxito de uso no setor é devido à comparativa instabilidade dos corantes sintéticos utilizados nessas aplicações (PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992). As preparações de urucum também são usadas em produtos de maquiagem e de tintura de tecidos (PIMENTEL, 1995).

Atualmente, na indústria de alimentos, 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, dentre outros (LIMA et al., 2001).

O extrato lipossolúvel do urucum foi um dos primeiros corantes a ser usado em margarina e manteiga. O corante hidrossolúvel tem sido, por sua vez, tradicionalmente empregado em queijos. Apresenta aplicação também em produtos cárneos como salsichas, peixes defumados e, quando na forma de pó, em bebidas instantâneas e misturas secas.

A combinação de corante de urucum com outros corantes naturais aumenta as aplicações em alimentos, pela possibilidade de se produzirem variadas matizes de cor. Tradicionalmente, urucum e curcumina têm sido misturados em produtos aquosos e oleosos. Esta combinação é desejável quando se necessita de uma tonalidade mais amarelada. Coloração avermelhada pode ser obtida quando o urucum é misturado com carmim, beterraba ou antocianinas. A coloração escura é obtida quando se misturam urucum e clorofila (ROSA, 2004).

Os corantes de urucum podem ser utilizados em remédios (líquidos e sólidos), em corantes, vernizes e ceras para madeira, no tingimento de tecidos, couros e fibras em geral, em cromatografia de tela, película e filme e em óleos vegetais hidrogenados (FARIA e COSTA, 1998). Na alimentação animal, o urucum também vem ampliando a sua posição de destaque. O extrato ou o grão triturado do urucum entra na formulação de rações avícolas, pois este carotenóide pode influenciar a pigmentação da casca e da gema de ovos (SILVA et al., 2000).

As propriedades medicinais do urucum ainda são pouco estudadas e compreendidas. As partes utilizadas da planta são as folhas, frutos e sementes. Os extratos das sementes do urucum, em estudos com animais, apresentaram, como ações farmacológicas, atividade diurética e hipoglicemiante, assim como uma capacidade de diminuir a atividade motora. Às folhas foi atribuído efeito hipoglicemiante, antídoto antiofídico, efeito antibacteriano, antimalárico e antifúngico (FITOTERAPIA, 2003). Popularmente, a tintura das folhas é empregada como antigonorréica, anti-emética, como gargarejo em dores de garganta e na higiene oral (FLEISCHER et al., 2003).

Dentre os carotenóides naturais, a bixina pode contribuir para a proteção de células e tecidos contra os radicais livres (SILVA et al., 2001).

LIMA et al. (2001) avaliaram os efeitos da ingestão de bixina, norbixina e quercetina no metabolismo lipídico de coelhos. Dentre as substâncias estudadas, a bixina apresentou o melhor efeito sobre a redução do colesterol e a manutenção dos níveis de colesterol-HDL mais elevados, e a quercetina apresentou efeito sobre a redução dos triacilgliceróis. Estes resultados são promissores, mostrando que no futuro estas substâncias poderão ser utilizadas como fármacos no tratamento ou na prevenção de doenças cardíacas.

FLEISCHER et al. (2003), em seus estudos, mostraram que o extrato etanólico de folhas e sementes de *Bixa orellana* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

BARBOSA FILHO (2006) fez um levantamento de estudos científicos realizados em países do continente americano, que avaliavam atividades farmacológicas do urucum e de seus extratos, em diferentes partes da planta. Alguns dos estudos científicos pesquisados respaldaram alguns usos populares do urucum, como a atividade hipoglicemiante (diabetes), atividade repelente de insetos (inseticida), atividade antigonorréica (gonorréia), atividade hipotensora (hipotensão). Uma outra propriedade encontrada para a planta foi relacionada à amenização ou à neutralização da ação hemorrágica do veneno de *Botrops atrox*, uma serpente muito comum na região nordeste da Colômbia.

O pigmento do urucum pode passar por uma série de reações, que podem afetar seu desempenho como corante e suas ações farmacológicas. Sendo assim, é necessário elucidar o comportamento do pigmento nos diversos tipos de sistemas alimentícios e as propriedades funcionais e farmacológicas de diferentes extratos da planta, de maneira a otimizar o seu emprego.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) E CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS OBTIDOS

1. INTRODUÇÃO

O urucum é um corante natural extraído do pericarpo seco das sementes de *Bixa orellana* L. Apresenta coloração amarelo-alaranjada e o principal componente corante é o diapocarotenóide lipossolúvel 9'-*cis*-bixina (PRABHAKARA-RAO et al., 2002). Os corantes são encontrados recobrimdo a superfície externa das sementes de urucum e são constituídos na sua maioria (cerca de 80%) de 9'-*cis*-bixina, que é um éster monometílico do ácido carboxílico da 9'-*cis*-norbixina (TOLEDO et al., 2004).

O urucum apresenta-se como uma das principais matérias-primas encontradas no país para obtenção de corantes naturais. Contudo, sua industrialização requer o conhecimento tecnológico, que permita a obtenção de corantes a baixo custo e com qualidade aceitável, capazes de competir no mercado internacional (CASTRO e FARIA, 1992; PÓVOA et al., 1996).

Os métodos de extração utilizados para a produção de corantes de urucum a partir da semente podem envolver a produção de bixina ou, por meio da hidrólise aquosa, extração simultânea da norbixina. Talvez o que torna o urucum uma das matérias-primas mais interessantes para a extração

de corantes seja a possibilidade de se obter, de um mesmo tipo de semente, corantes solúveis em água e corantes solúveis em óleo, apenas alterando o solvente de extração (LIMA et al., 2001). Os métodos mais utilizados para extrair o pigmento das sementes são a extração alcalina, resultando na formação do sal da norbixina; a extração em óleo, extraindo bixina, e a extração com solvente, resultando na extração mais pura da bixina. Tais corantes diferem entre si na solubilidade e pigmentação (PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG, 1992).

Os fatores que afetam a taxa de extração dos pigmentos do urucum são o tamanho da semente, o solvente utilizado, a temperatura e a agitação. Partículas menores, com grande área de superfície, podem ser lixiviadas e em partículas maiores o solvente tem menos contato com superfície a ser extraída. O solvente deve ser de baixa viscosidade, circulando livremente no sistema e, como os sais de potássio e sódio têm baixa viscosidade e são muito solúveis em água, o sal de sódio ou potássio de bixina é rapidamente solubilizado em água. Com relação à temperatura, de uma maneira geral a extração ocorre melhor quanto maior for a temperatura de trabalho. No entanto, a bixina é sensível a temperaturas acima de 100 °C. O solvente deverá se misturar intimamente com a semente, para uma maior remoção dos pigmentos.

O urucum vem conquistando cada vez mais importância econômica, devido à produção de vários tipos de corantes extraídos a partir de suas sementes, cujo pericarpo é rico em pigmentos, os quais têm ampla aplicação industrial (farmacêutica, laticínios, de bebidas, têxteis, de alimentos, de tintas e de cosméticos).

Com base nestes fatos, os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência da extração dos pigmentos de urucum, utilizando diferentes solventes, em termos do teor de bixina e/ou norbixina extraídos, e caracterizar cada pigmento obtido por meio de cada processo de extração, obtendo uma avaliação global de cada processo de produção de corantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG, e no Laboratório de Solos Florestais, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa - MG.

2.1. MATERIAL

A matéria-prima empregada foi a semente do urucum (*Bixa orellana* L.), variedade Embrapa 36/37, adquirida no município de Teixeira de Freitas – BA, em fevereiro de 2006.

As sementes recebidas foram armazenadas em refrigerador a 10 °C, de acordo com o recomendado por STRINGHETA et al. (1999).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Caracterização das Sementes de Urucum

2.2.1.1. Teor de Pigmentos e de Umidade das Sementes

Na fase inicial deste estudo foi efetuada a determinação do teor de pigmentos, expresso em percentual de bixina, nas sementes recebidas, de acordo com metodologia descrita por STRINGHETA et al. (1999), que se baseia na extração dos pigmentos das sementes por uma solução

concentrada de hidróxido de potássio, e posterior diluição e determinação do teor de pigmentos por espectrofotometria, com leitura a 480 nm. A determinação do teor de bixina nas sementes de urucum foi feita em 3 repetições.

A determinação do teor de umidade das sementes de urucum foi feita de acordo com a metodologia descrita nas normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), baseando-se na secagem da amostra em estufa a 105 °C, até que se atingisse peso constante. Esta determinação foi feita em 3 repetições.

2.2.2. Produção dos Corantes de Urucum

Para a produção dos corantes de urucum foram utilizados os solventes de extração:

- solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 N;
- solução aquosa de hidróxido de amônio (NH₄OH) 0,5 N;
- etanol comercial (92,8%);
- hidróxido de amônio (NH₄OH) 0,5 N em etanol 60%.

A proporção semente:solvente utilizada foi de 1:6. As extrações se deram por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente.

2.2.2.1. Extração com os Solventes Aquosos

Inicialmente as sementes foram pesadas (100 g) e submetidas à extração em um recipiente sob agitação, com os solventes KOH 0,1 N ou NH₄OH 0,5 N. Em seguida, o extrato foi peneirado, as sementes foram guardadas para análises posteriores, recuperando-se o extrato. O extrato foi filtrado a vácuo, a fim de separar impurezas, que foram descartadas. O extrato filtrado, que poderia conter norbixinato de potássio ou amônio (de acordo com o solvente de extração utilizado), teve seu pH corrigido para 8,0, com a adição de solução de ácido cítrico saturado.

Em seguida, os extratos líquidos foram adicionados de maltodextrina até que atingisse 16,5% de sólidos totais. Os extratos, antes de serem desidratados, foram submetidos ao aquecimento até que atingissem a

temperatura de 40 °C, para que facilitasse a sua secagem no equipamento “spray-dryer”. Foi utilizado um mini spray-dryer da marca Buchi, modelo B – 191, nas seguintes condições operacionais: vácuo (30 mbar), temperatura do ar de entrada (180 ± 5 °C), temperatura do ar de saída (80 ± 5 °C) e pressão manométrica positiva. Após a secagem, os corantes na forma de pó contidos nos recipientes coletores do “spray-dryer” foram resfriados até a temperatura ambiente. Em seguida, foram homogeneizados, acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados em freezer (-18 ± 2 °C) para análises posteriores.

As etapas do processo de produção do corante encontram-se resumidas na Figura 1.

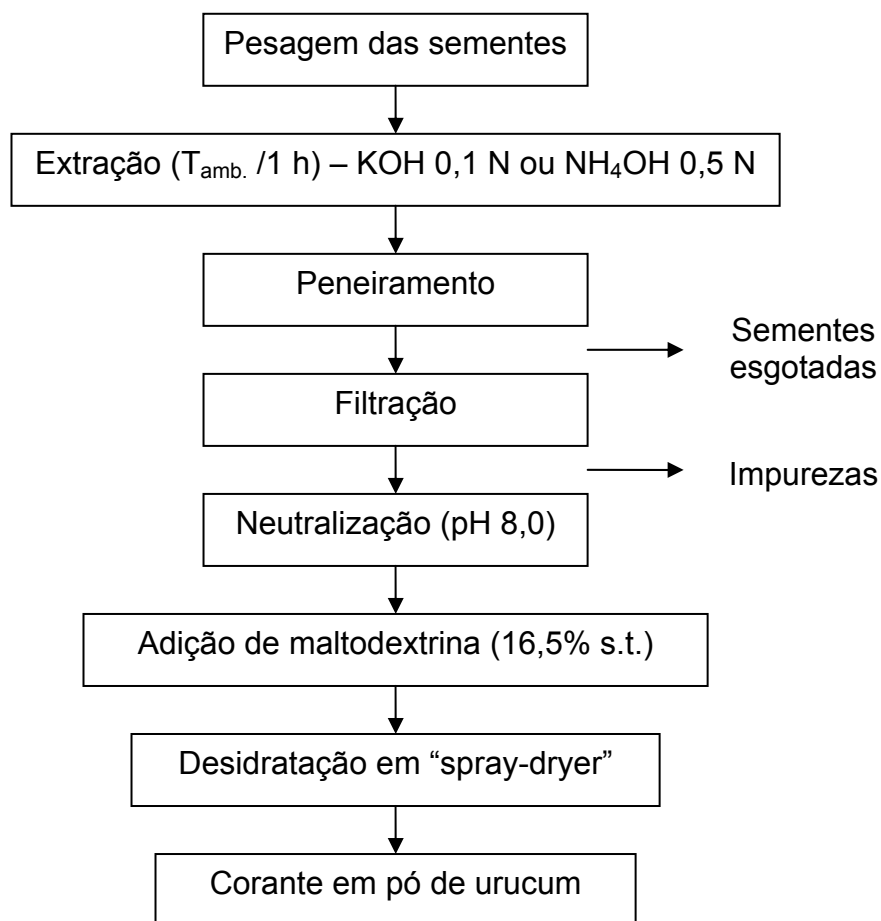


Figura 1: Produção de corantes hidrossolúveis de urucum (norbixinato).

2.2.2.2. Extração com o Solvente Alcoólico Alcalino

Inicialmente as sementes foram pesadas (100 g) e submetidas à extração com o NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, em um recipiente sob agitação. Em seguida, o extrato foi peneirado, as sementes foram guardadas para análises posteriores, recuperando-se o extrato. O extrato foi, então, filtrado a vácuo, a fim de separar impurezas, que foram descartadas. O extrato filtrado, que poderia conter norbixinato de amônio, foi neutralizado a pH 8,0 com adição de solução de ácido cítrico saturado. Em seguida, o ácido cítrico foi gotejado no extrato lentamente, de forma que se obtivesse um abaixamento gradual do pH, até que fosse atingido o pH 3,5, no qual já ocorreu a precipitação da norbixina.

O extrato acidificado foi mantido em repouso durante 12 horas para que ocorresse a decantação da norbixina no fundo do recipiente. O sobrenadante foi filtrado a vácuo e posteriormente descartado. A “massa” corante obtida foi recuperada e submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 45 °C, durante 30 minutos.

Após a secagem, os corantes na forma de pasta foram homogeneizados, acondicionados em sacos de polietileno de alta densidade, e armazenados em freezer (-18 ± 2 °C) para análises posteriores.

As etapas do processo de produção do corante encontram-se resumidas na Figura 2.

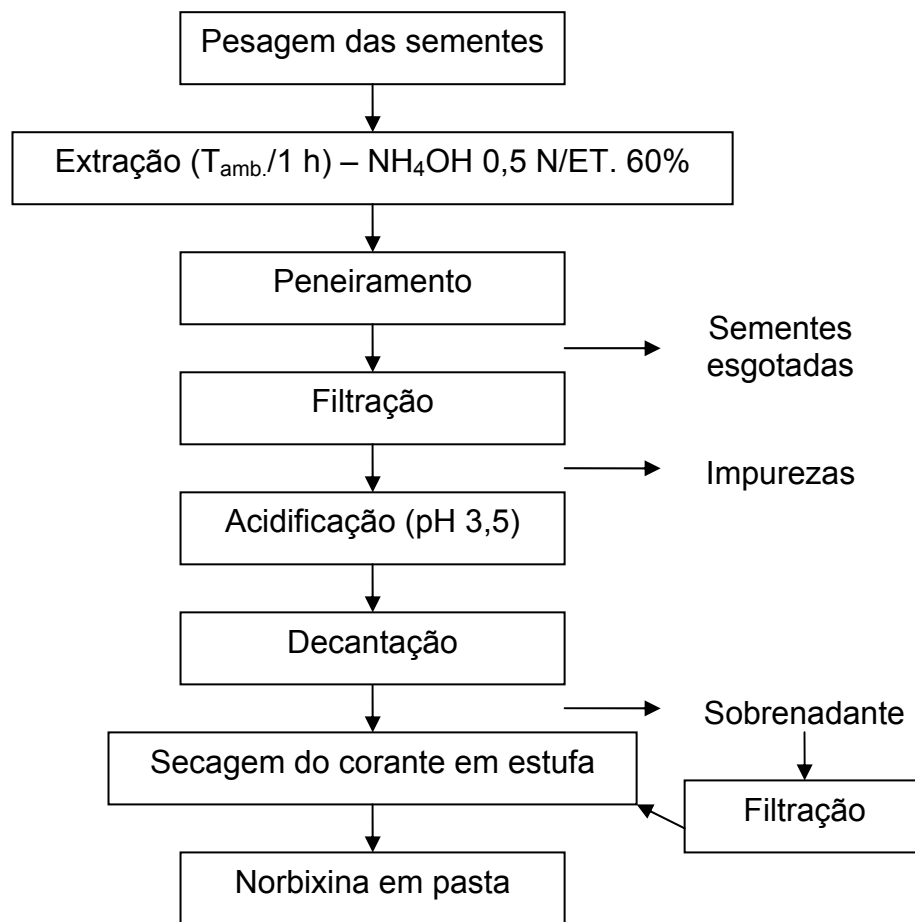


Figura 2: Produção de corante em pasta (norbixina).

2.2.2.3. Extração com Etanol Comercial

De forma semelhante aos outros solventes, a extração foi feita em temperatura ambiente, utilizando o etanol comercial (92,8%).

Inicialmente as sementes foram pesadas (100 g) e submetidas à extração em um recipiente sob agitação. Em seguida, o extrato foi peneirado, as sementes foram guardadas para análises posteriores, recuperando-se o extrato.

O extrato foi colocado em um recipiente de vidro para que precipitasse durante 4 horas, de acordo com descrição de PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG (1992). Após a separação, a fase superior (sobrenadante) foi eliminada e a fase inferior (pigmento) foi recuperada. O pigmento foi submetido à secagem rápida em estufa de circulação forçada de ar a 45 °C por 30 minutos. A “massa” corante obtida foi, então,

acondicionada em sacos de polietileno de alta densidade, e armazenada em freezer (-18 ± 2 °C) para análises posteriores.

As etapas do processo de produção do corante encontram-se resumidas na Figura 3.

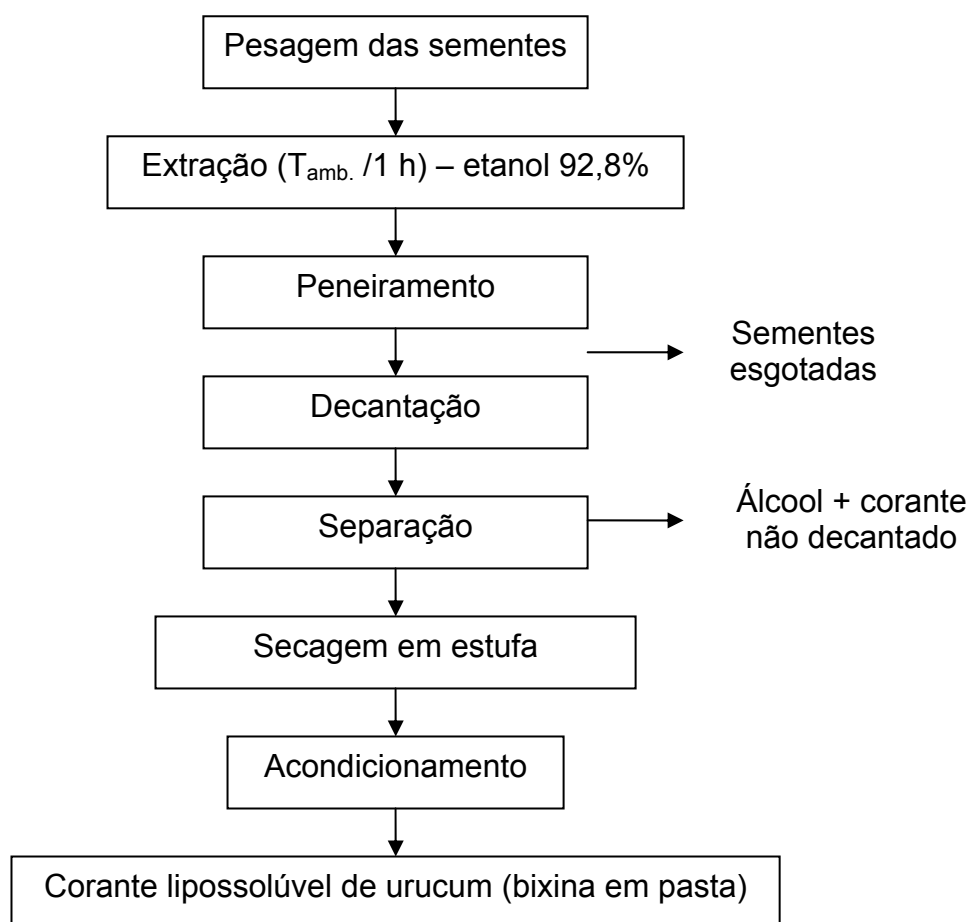


Figura 3: Produção de corante lipossolúvel em pasta (bixina).

2.2.3. Determinação da Eficiência da Extração

Para determinar a eficiência da extração dos pigmentos das sementes de urucum obtidos com os solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial, o teor de bixina das sementes foi avaliado antes e após a extração com os solventes, utilizando a metodologia descrita por STRINGHETA et al. (1999). O teor de umidade das sementes esgotadas também foi avaliado após a extração com os solventes

estudados, de forma a possibilitar a conversão dos teores de bixina residuais para base seca, de acordo com metodologia utilizada por PIMENTEL (1995).

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software SAS for Windows V8.

2.2.4. Caracterização dos Corantes Produzidos

2.2.4.1. pH dos Extratos

Os extratos brutos, após o término de cada extração, tiveram seus pH iniciais medidos utilizando-se um potenciômetro da marca Digimed, modelo DM20, em três repetições.

2.2.4.2. Teores de Bixina e Norbixina dos Corantes

O teor de bixina no corante produzido pela extração com o solvente etanol 92,8% foi determinado de acordo com metodologia utilizada por TOCCHINI e MERCADANTE (2001), baseando-se na determinação espectrofotométrica da bixina pela diluição da amostra em clorofórmio, utilizando-se o comprimento de onda de 470 nm (máxima absorção) e coeficiente de absorvidade ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.826. Foi utilizado um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV - 1601PC.

O teor de norbixina nos corantes produzidos pela extração com KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60% foi determinado de acordo com metodologia descrita por CHRISTIAN HANSEN (2000b), que descreve a análise para norbixina diluindo-se a amostra para determinação espectrofotométrica em KOH 0,5%, utilizando-se o comprimento de onda de 482 nm (máxima absorção) e coeficiente de absorvidade ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.870.

Os teores de bixina e norbixina foram determinados nos extratos logo após a extração com os quatro solventes avaliados, e também foram determinados nos corantes em pó produzidos após a secagem por atomização em “spray-dryer” (para os corantes produzidos com KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N), após a precipitação ácida e secagem (para o corante

produzido com NH_4OH 0,5 N em etanol 60%), e após a decantação e secagem em estufa (para o corante produzido com etanol 92,8%).

Os delineamentos experimentais foram do tipo inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.4.3. Teor de Umidade

Os teores de umidade dos corantes concentrados em pó e em pasta produzidos foram determinados para os corantes produzidos com os solventes KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial, por meio da secagem da amostra em estufa a 105 °C, até que se atingisse peso constante, de acordo com o recomendado pelas normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), em três repetições.

2.2.4.4. Teor de Sólidos Totais

Os teores de sólidos totais dos extratos obtidos pela extração com KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol 92,8% e dos corantes concentrados produzidos foram determinados seguindo os procedimentos descritos nas normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), em três repetições.

A determinação do teor de sólidos totais dos extratos líquidos antes de serem submetidos à secagem por atomização em “spray-dryer” foi útil para que se adicionasse a massa adequada de maltodextrina a esses extratos, com auxílio de um balanço de massa, de forma a que se assegurasse que o teor de sólidos totais antes da atomização estivesse nos níveis recomendados.

2.2.4.5. Teor de Cinzas

O teor de cinzas dos corantes concentrados produzidos pelos diferentes métodos de extração utilizando-se os solventes KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial foi determinado de acordo com metodologia proposta pelas normas analíticas

do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), sendo um indicativo do grau de impurezas do produto.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.4.6. Determinação de Resíduo de Amônia

Os teores de nitrogênio total foram determinados para a bixina das sementes de urucum (amostra em pasta) e para os corantes produzidos com o solvente NH_4OH nos meios aquoso e alcoólico. A bixina foi extraída das sementes utilizando o álcool etílico como solvente, e foi seca em estufa até que atingisse a consistência de pasta. Em seguida, foi analisado o teor de nitrogênio total a partir da “massa corante” obtida, por meio do processo de digestão Kjeldahl, descrito pelas normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

O resíduo de amônia nos corantes concentrados extraídos com a solução de NH_4OH em meio aquoso e em meio alcoólico também foi determinado por meio do processo de digestão Kjeldahl.

Os resultados obtidos dos corantes concentrados foram descontados daqueles da bixina em pasta, sendo um demonstrativo confiável do resíduo deixado pelo solvente NH_4OH .

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.4.7. Determinação de Potássio

Os teores de potássio foram determinados para a bixina das sementes de urucum extraídas com álcool etílico, conforme descrito em 2.2.4.6., e para os corantes produzidos com o solvente KOH em meio aquoso.

Na bixina em pasta e nos corantes concentrados produzidos com o KOH , o teor de potássio foi analisado a partir das cinzas obtidas do material, por meio de espectroscopia de absorção atômica, conforme descrito por

MILLER (1999). Foi utilizado um espectrofotômetro de chama marca Corning, modelo 400.

Os resultados encontrados para os corantes concentrados foram descontados daqueles obtidos para a bixina em pasta, para que se quantificasse o incremento no teor de potássio devido ao processamento do corante com a base KOH 0,1 N.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.4.8. Caracterização Colorimétrica dos Extratos Brutos e Corantes Concentrados

Os extratos e os corantes concentrados em pó foram caracterizados pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul), empregando a escala de cor CIELAB, utilizando um colorímetro Hunter Lab, modelo Colorquest XE, conforme metodologia adaptada de CONSTANT (2003). De posse dos valores de “a*” e “b*”, foram calculados os parâmetros “h” (tonalidade), definido como o $\arctan(b^*/a^*)$ e o parâmetro “c” (cromaticidade ou saturação), definido como a raiz quadrada de $(a^{*2} + b^{*2})$. Desta forma, foi obtida uma completa caracterização da cor de cada extrato e de cada corante concentrado.

Os extratos brutos obtidos com os solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60% foram submetidos à análise colorimétrica a pH 8,0, após a etapa de extração, enquanto o extrato obtido com etanol 92,8% foi analisado em seu pH inicial (cerca de 6,0).

Os corantes concentrados (em pó e em pasta) foram pesados e solubilizados antes de serem submetidos à leitura colorimétrica. Para os corantes em pó produzidos por KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N em secagem por “spray-dryer”, foram pesados 500 mg de corante, dissolvidos em 40 mL de água. Para o corante produzido por NH₄OH 0,5 N em etanol 60% pesou-se 250 mg de corante e dissolveu-se em 40 mL de KOH 0,1 N. Já para o corante produzido por etanol comercial, foram pesados 250 mg de corante,

dissolvidos em 40 mL de etanol comercial. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.5. Determinação da Curva de Cor *versus* pH

A fim de se comparar o efeito da mudança de solvente alcalino na coloração dos extratos de urucum, foram traçados os perfis colorimétricos em relação ao abaixamento do pH de extratos obtidos com os solventes KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N. Os extratos brutos foram obtidos pela extração com os solventes mencionados durante uma hora, em recipientes com agitação, na proporção semente:solvente de 1:6, à temperatura ambiente. Os extratos foram, então, submetidos à medida do pH em potenciômetro. A partir do pH inicial de cada extrato, foi adicionado HCl 1,5 N a fim de se obter pequenas quedas dos valores de pH. A cada valor de pH alcançado, foi feita uma avaliação colorimétrica dos extratos (L^* , a^* , b^* , h e c), pela leitura direta de reflectância. Os extratos foram acidificados até atingirem um pH próximo de 2,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das Sementes de Urucum

3.1.1. Teor de Pigmentos e Teor de Umidade das Sementes

As sementes de urucum apresentaram um teor médio de bixina de 3,4 g/100 g, expresso em base seca.

O teor de umidade médio das sementes de urucum foi 9,6 g/100 g.

3.2. Eficiência da Extração

O Quadro 1 apresenta os teores médios de bixina das sementes esgotadas, obtidos após a extração com os solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial.

Quadro 1: Teor de bixina/norbixina nas sementes esgotadas, em base seca.

Solvente extrator	Teor de bixina* (g/100 g)
Etanol comercial	1,05 ± 0,03** a
KOH 0,1 N	0,35 ± 0,01 b
NH ₄ OH 0,5 N	0,34 ± 0,03 b
NH ₄ OH 0,5 N/Et 60%	0,23 ± 0,02 c

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Média ± desvio-padrão.

De acordo com o exposto no Quadro 1, a melhor extração foi aquela utilizando a solução de NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, o que correspondeu ao menor teor de pigmentos residuais nas sementes e, conseqüentemente, à maior eficiência na extração. Os solventes aquosos KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, indicando eficiência semelhante. O etanol comercial apresentou o teor de bixina residual mais elevado, sendo o solvente menos eficiente na extração da bixina nas condições deste estudo.

Em termos percentuais, o etanol comercial alcançou uma eficiência de extração relativamente baixa, de cerca de 60%. Já as soluções de KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N apresentaram eficiência de cerca de 80%. Para o solvente mais eficiente, o NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, a eficiência foi de 84%.

PÓVOA (1992) verificou que a utilização do KOH 0,5% possibilitou a extração de, aproximadamente, 98% dos pigmentos da semente, e verificou que a maior retenção de pigmentos na semente foi encontrada quando se utilizou água como solvente, correspondendo a 4,3 vezes o teor encontrado nas sementes extraídas com o KOH 0,5%, que apresentou a menor retenção de pigmentos na semente.

3.3. Caracterização dos Corantes Produzidos

3.3.1. Extratos Líquidos

O Quadro 2 apresenta os valores médios dos pH na extração dos pigmentos de urucum, e os teores médios de pigmento, umidade e sólidos totais para cada extrato produzido pelos solventes KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial.

Quadro 2: Caracterização dos extratos líquidos de urucum obtidos com os diversos solventes.

Análises	Extratos Líquidos			
	KOH 0,1 N	NH ₄ OH 0,5 N	NH ₄ OH 0,5 N/ ET 60%	Etanol 92,8%
pH	12,4 ± 0,13*	10,5 ± 0,07	10,3 ± 0,02	6,1 ± 0,01
Teor de bixina** (g/100 mL)	1,41 ± 0,20 a	1,66 ± 0,14 a	1,33 ± 0,13 a b	1,00 ± 0,11 b
Umidade (g/100 g)	97,51 ± 0,04	96,91 ± 0,03	97,30 ± 0,05	98,46 ± 0,04
Sólidos totais (g/100 g)	2,49 ± 0,04	3,09 ± 0,03	2,70 ± 0,05	1,54 ± 0,04

*Média ± desvio-padrão.

**Médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Observou-se que nas extrações com solventes alcalinos, que apresentaram valores de pH mais elevados, acima de 10,0, (Quadro 2) os pigmentos encontravam-se totalmente solúveis nos extratos. Já na extração com etanol comercial, com pH próximo da neutralidade, a bixina se encontrava parcialmente solúvel e, ao deixar o sistema em repouso, ela se decantou no fundo do recipiente.

O pH do solvente extrator é uma informação importante já que sua variação implica em variação dos pigmentos presentes no extrato, como bixina, norbixina e seu sal, bem como na solubilidade destes compostos no meio. Em pH mais alcalinos, além da bixina estar plenamente solubilizada no meio, ela pode ser saponificada, dando origem ao sal da norbixina (norbixinato).

Observou-se, de acordo com o Quadro 2, que os teores de pigmentos extraídos com os solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60% não diferiram estatisticamente. O etanol comercial foi o solvente que extraiu o menor teor de pigmentos, comparados aos outros

solventes. Entretanto, o NH_4OH 0,5N em etanol 60%, se comparado ao etanol comercial, não diferiu estatisticamente deste último.

Quanto ao teor de sólidos, observou-se que os solventes de extração mais eficientes renderam extratos com teor de sólidos totais mais elevados, o que poderia estar diretamente relacionado ao poder extrator destes solventes, mas não necessariamente ao maior teor de pigmentos encontrado em cada extrato. Deve ser ressaltado, também, que o teor de sólidos totais para os solventes KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N e NH_4OH 0,5 N em etanol 60% foram obtidos em pH 8,0. Para tal, estes extratos foram acidificados de seus pH iniciais até este pH utilizando-se solução de ácido cítrico saturado, o que poderia ter levado a um aumento no teor de sólidos totais dos extratos devido à formação de sais, como o citrato de potássio e o citrato de amônio.

O teor de sólidos totais nos extratos foi uma informação importante para que fosse determinada a massa de maltodextrina a ser adicionada em solução, para que se atingisse o teor de sólidos adequados (neste trabalho, 16,5%) para a secagem por atomização em “spray-dryer”.

3.3.2. Corantes em Pó e em Pasta

O Quadro 3 apresenta os teores médios de pigmentos, umidade, sólidos totais, cinzas, residual de amônia e potássio para os corantes em pó produzidos pela extração com os solventes KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N, por secagem em “spray-dryer”, e para os corantes em pasta produzidos pela extração com os solventes NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial, por secagem em estufa.

Quadro 3: Caracterização dos corantes em pó e em pasta de urucum obtidos com os diversos solventes.

Análises	Corantes Concentrados			
	KOH 0,1 N	NH ₄ OH 0,5 N	NH ₄ OH 0,5 N/ ET 60%	Etanol 92,8%
Teor de bixina (g/100 g) b.s. ¹	1,19 ± 0,05*	1,59 ± 0,06	20,5 ± 0,80	33,5 ± 0,07
Umidade (g/100 g)	4,70 ± 0,33	8,75 ± 0,41	25,62 ± 0,84	17,47 ± 0,90
Sólidos totais (g/100 g)	95,29 ± 0,33	91,25 ± 0,41	74,38 ± 0,84	82,53 ± 0,90
Cinzas [†] (g/100 g)	2,98 ± 0,43 a	0,55 ± 0,01 c	0,26 ± 0,02 c	2,07 ± 0,11 b
Residual de amônia [†] (g/100 g) b.s. ¹	-	1,72 ± 0,02 a	1,69 ± 0,14 a	0,56 ± 0,04 b
Teor de potássio [†] (g/100 g) b.s. ¹	1,00 ± 0,08 a	-	-	0,47 ± 0,07 b

¹ Em base seca.

* Média ± desvio-padrão.

[†] Médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Como os corantes concentrados foram produzidos por métodos diferentes (KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N – secagem em “spray-dryer”, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% - precipitação e secagem em estufa, etanol comercial – secagem em estufa), seus teores de pigmentos não foram comparados estatisticamente. Nota-se que houve discrepância nos teores de pigmentos obtidos nos corantes em pó para os diferentes solventes avaliados, de acordo com o Quadro 3. Utilizando-se o mesmo processo de produção, no caso da secagem em “spray-dryer”, os valores foram diferentes para os dois solventes utilizados.

No processo de produção de corantes por “spray-dryer”, apesar de se produzirem corantes com baixos teores de umidade, as concentrações de pigmento nos pós não foram as mais elevadas, quando comparadas aos

processos de secagem em estufa. Este fato está relacionado à adição de maltodextrina imediatamente antes da secagem, aos extratos, numa relação aproximada de 1:10 (bixina:maltodextrina). Com a eliminação instantânea de grande parte da água do extrato durante o processo de spray-drying, ocorreria a concentração dos sólidos do extrato, mas o percentual de bixina permaneceria baixo, devido à grande massa de maltodextrina presente. Ainda, poderia ter ocorrido a degradação do pigmento nas condições de secagem, o que explicaria os baixos teores encontrados.

Durante a concentração em estufa dos extratos produzidos por etanol comercial e por NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, como não houve adição da maltodextrina, ao se eliminar a água do sistema, os sólidos, que consistiam basicamente dos pigmentos presentes no extrato, se concentraram e, com isso, atingiram-se maiores teores de bixina e norbixina nos produtos finais.

SOUZA (2000), ao estudar a extração de pigmentos de urucum utilizando etanol, produziu corantes concentrados apresentando teor de bixina de 70 a 72%. PRENTICE-HERNANDEZ e RUSIG (1992) também produziram extratos de urucum utilizando álcool etílico, com o pigmento sólido decantado e seco em estufa. Foi obtido um teor de bixina no extrato seco de 65%, partindo de uma semente contendo 2,3% de bixina.

PIMENTEL (1995) produziu corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida e secagem em estufa, a partir das soluções extratoras KOH 0,1 N e NH_4OH 0,52 N em etanol a 58%. Na produção do corante em pó, observou-se que a menor perda de norbixina (2,08%) foi obtida em extrato produzido com a solução de NH_4OH . Com a solução de KOH as perdas de norbixina foram de 12,86%, em razão do maior tempo de secagem. Os teores de norbixina obtidos nos corantes em pó foram de 22,57% para corante obtido com a solução de hidróxido de amônio e de 8,55% para o corante obtido com a solução de hidróxido de potássio.

No tocante ao teor de umidade dos corantes concentrados, de acordo com o Quadro 3, quando se utilizou o processo de secagem por atomização em “spray-dryer”, os diferentes solventes empregados na fabricação dos extratos renderam corantes em pó com teores de umidade distintos. Deve ser ressaltado aqui que as condições de secagem do

equipamento não foram rigidamente controladas, já que este foi utilizado apenas como uma ferramenta para se produzir os corantes em pó, de armazenamento mais prático. O maior teor de umidade apresentado pelo corante produzido por NH_4OH 0,5 N, em comparação àquele produzido por KOH 0,1 N, pode ter sido devido à maior higroscopicidade dos sais de amônio.

Nos métodos de secagem em estufa, utilizados para a produção dos corantes com etanol comercial e NH_4OH 0,5 N em etanol 60% os teores de umidade final alcançaram valores mais elevados, e aqui, também, o tempo e as condições de secagem não foram rigidamente controlados. Foram obtidas amostras pastosas dos corantes em questão.

Quanto ao teor de cinzas dos corantes, de acordo com o Quadro 3, o que apresentou o maior teor foi aquele produzido pela extração com KOH 0,1 N. O corante em pasta produzido pela extração com o etanol comercial apresentou o segundo maior teor de cinzas. Já para os corantes produzidos com o solvente NH_4OH 0,5 N em meios aquoso e alcoólico os teores de cinzas foram baixos, e ambos os corantes não apresentaram diferença estatística quanto a este teor. O teor de cinzas mais elevado obtido para o corante produzido com o KOH 0,1 N foi provavelmente devido à formação do sal citrato de potássio na etapa de neutralização do pH para 8,0 com ácido cítrico. Já o teor de cinzas encontrado para o corante produzido com etanol comercial pode ser devido à presença de impurezas minerais no solvente. Entretanto, segundo GOMES et al. (2003) nem sempre o resíduo mineral fixo (cinzas) representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização neste aquecimento. Este fato poderia explicar os baixos teores de cinzas encontrados para os corantes produzidos com o solvente NH_4OH 0,5 N em meios aquoso e alcoólico, pela formação de um sal de amônio que pode ter volatilizado durante a análise.

PÓVOA (1992), avaliando a extração de corantes de urucum utilizando os solventes etanol 95%, água, óleo de soja e KOH 0,5%, encontrou um teor de cinzas de 35,59% para o corante produzido por KOH 0,5% e de 1,57% para o corante produzido pelo etanol. Segundo o autor, o

nível elevado de cinzas no extrato alcalino correspondeu, em grande parte, ao soluto da solução extratora.

Na determinação do resíduo de amônia considerou-se a premissa de que todo o nitrogênio presente nos corantes seria proveniente dos solventes a base de amônia. Contudo, a semente de urucum apresenta, em sua composição, alguns compostos nitrogenados como proteínas. Estes compostos podem ter sido arrastados para a solução por meio do atrito entre as sementes na hora da extração, contribuindo para o teor de nitrogênio encontrado para o corante produzido com etanol comercial, por exemplo, já que este solvente estaria livre de compostos nitrogenados. Como era de se esperar, a comparação entre os corantes produzidos pelos solventes a base de amônia e entre os corantes produzidos pelo etanol comercial foi estatisticamente diferente, conforme mostrado no Quadro 3, mostrando que houve um incremento do teor de nitrogênio nos corantes produzidos pelos solventes contendo amônia. Este incremento pode ter ocorrido talvez pela formação do sal norbixinato de amônio, já que na extração com soluções alcalinas pode ocorrer a saponificação da bixina, originando o sal de norbixina, e pela formação do sal citrato de amônio, no momento da neutralização do pH dos extratos.

PÓVOA (1992), ao determinar a composição centesimal de corantes em pó e em pasta produzidos com KOH 0,5% e com etanol, encontrou um teor de proteínas de 3,85% para o corante em pasta com KOH 0,5% e de 5,36% para o corante em pó com etanol. Os valores encontrados pelo autor foram superiores ao encontrado no presente trabalho, talvez pela sua realização de quatro ciclos de extração, que além de extraírem mais pigmentos, também extraem mais impurezas provenientes da semente. O autor ressaltou ainda que a composição centesimal dos extratos obtidos com cada solvente apresentou grande diversidade, conforme o solvente utilizado.

Na determinação de potássio, considerou-se a premissa de que todo o potássio presente nos corantes seria proveniente do solvente KOH 0,1 N. Conforme pode ser visto pelo Quadro 3, houve um considerável incremento do teor de potássio no corante de urucum quando se utilizou o solvente KOH 0,1 N. Este incremento, de modo similar ao ocorrido na determinação do residual de amônia para o solvente NH_4OH , pode ter sido devido à formação

do sal norbixinato de potássio, já que na extração com soluções alcalinas poderia ocorrer a saponificação da bixina, originando o sal de norbixina, e pela formação de outros sais de potássio no meio extrator. O corante produzido com etanol comercial apresentou baixos teores de potássio, que poderiam ser provenientes de impurezas do solvente, bem como compostos da semente contendo esse mineral poderiam ter sido arrastados do interior da semente no atrito da extração.

3.3.3. Caracterização Colorimétrica dos Extratos Brutos e Corantes Concentrados

As Figuras 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam os valores das coordenadas colorimétricas luminosidade – L* (Figura 4), intensidade de vermelho e verde – a* (Figura 5), intensidade de amarelo e azul – b* (Figura 6), tonalidade – h (Figura 7) e cromaticidade ou saturação – c (Figura 8), obtidos para os extratos e para os corantes concentrados (em pó e em pasta) produzidos com os solventes de extração KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial.

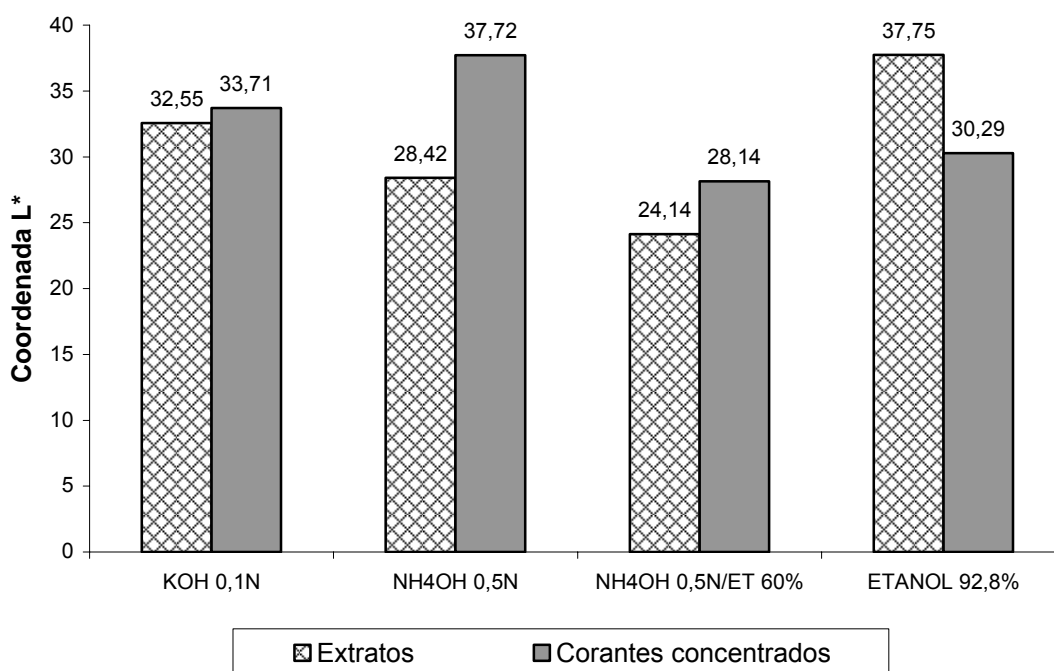


Figura 4: Valores da coordenada “L*” para os diferentes solventes nos extratos e corantes concentrados.

De acordo com a Figura 4, os extratos produzidos por KOH 0,1 N e por NH₄OH 0,5 N apresentaram valores próximos de luminosidade, que é a qualidade que caracteriza a claridade da cor. O extrato produzido por etanol comercial foi o que apresentou maior valor de L*, indicando ser o extrato mais claro, quando comparado aos demais extratos. Já o extrato produzido por NH₄OH 0,5 N em etanol 60% foi o que apresentou menor valor de L*, sendo o extrato mais escuro.

Com o processo de concentração dos extratos, notou-se um aumento da coordenada L*, exceto para o extrato produzido por etanol comercial, que teve uma diminuição da coordenada L*, se tornando mais escuro.

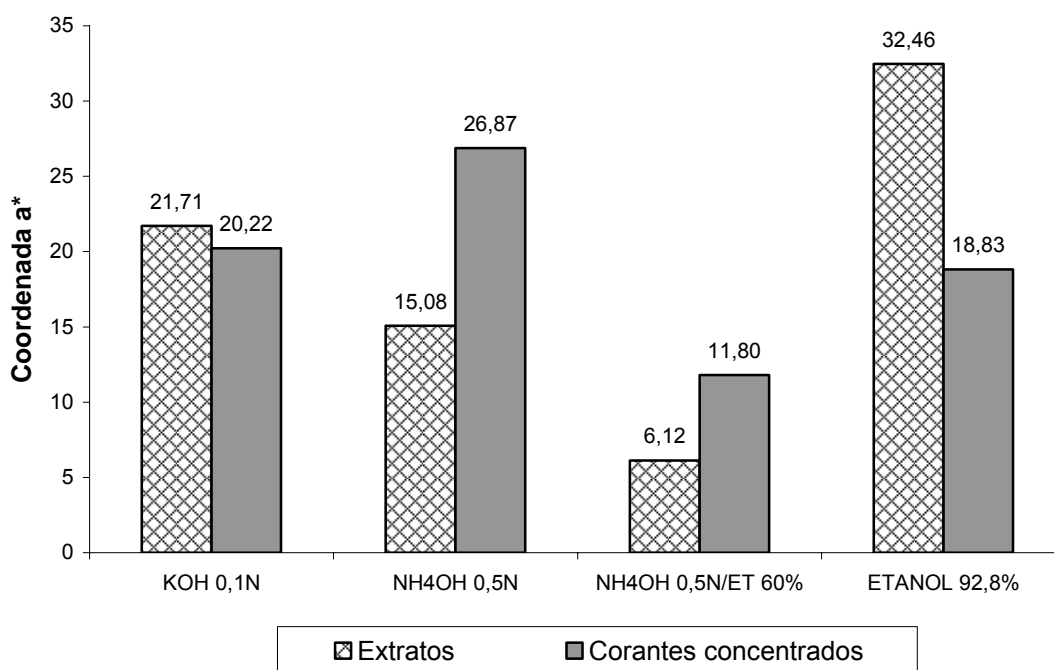


Figura 5: Valores da coordenada “a*” para os diferentes solventes nos extratos e corantes concentrados.

De acordo com a Figura 5, o extrato que apresentou maior intensidade de vermelho, representada pelo maior valor da coordenada a*, foi aquele produzido por etanol comercial e após, o extrato produzido pelo KOH 0,1 N. O menor valor de a* foi o do extrato produzido por NH₄OH 0,5 N em etanol 60%.

Com a concentração dos extratos, notou-se que eles apresentaram comportamentos distintos relacionados à coordenada a^* . Enquanto nos extratos produzidos por KOH 0,1 N e por etanol comercial a coordenada a^* diminuiu, nos extratos produzidos com NH_4OH 0,5 N e NH_4OH 0,5 N em etanol 60% os valores de a^* aumentaram, indicando que estes corantes concentrados apresentaram-se mais vermelhos.

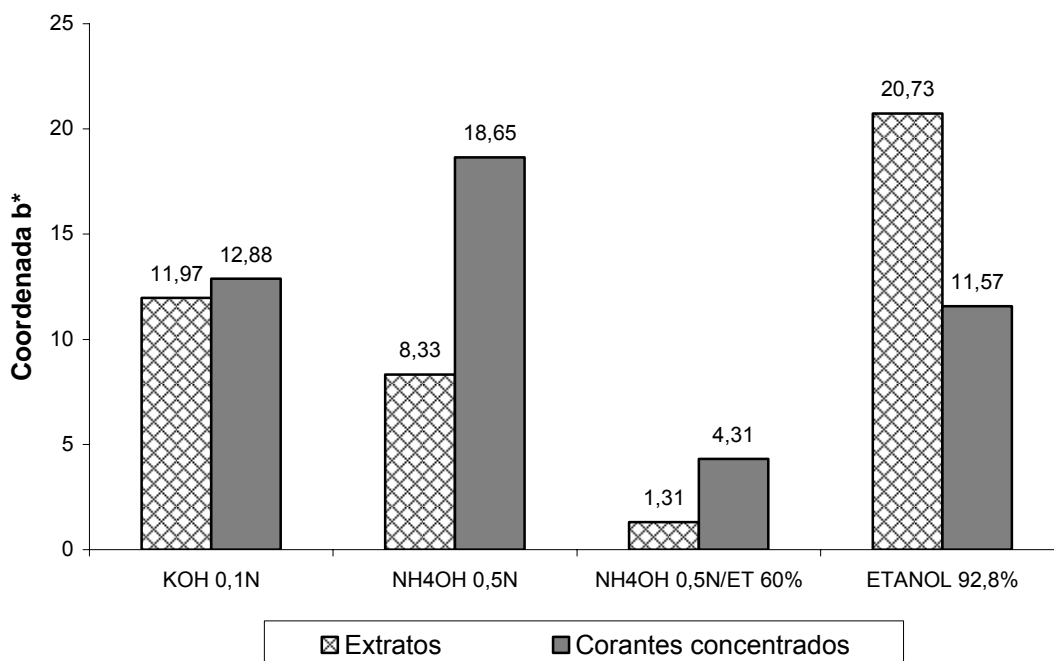


Figura 6: Valores da coordenada “ b^* ” para os diferentes solventes nos extratos e corantes concentrados.

De acordo com a Figura 6, o extrato que apresentou maior intensidade de amarelo, representado pelo maior valor de b^* , foi o produzido por etanol comercial, seguido daqueles produzidos por KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N, que apresentaram valores muito próximos. Já o extrato produzido por NH_4OH 0,5 N em etanol 60% apresentou baixa intensidade de amarelo.

Com a concentração dos pigmentos, observou-se aumento nos valores da coordenada b^* para todos os corantes, exceto para aquele produzido com etanol comercial, pelo qual a intensidade de amarelo diminuiu.

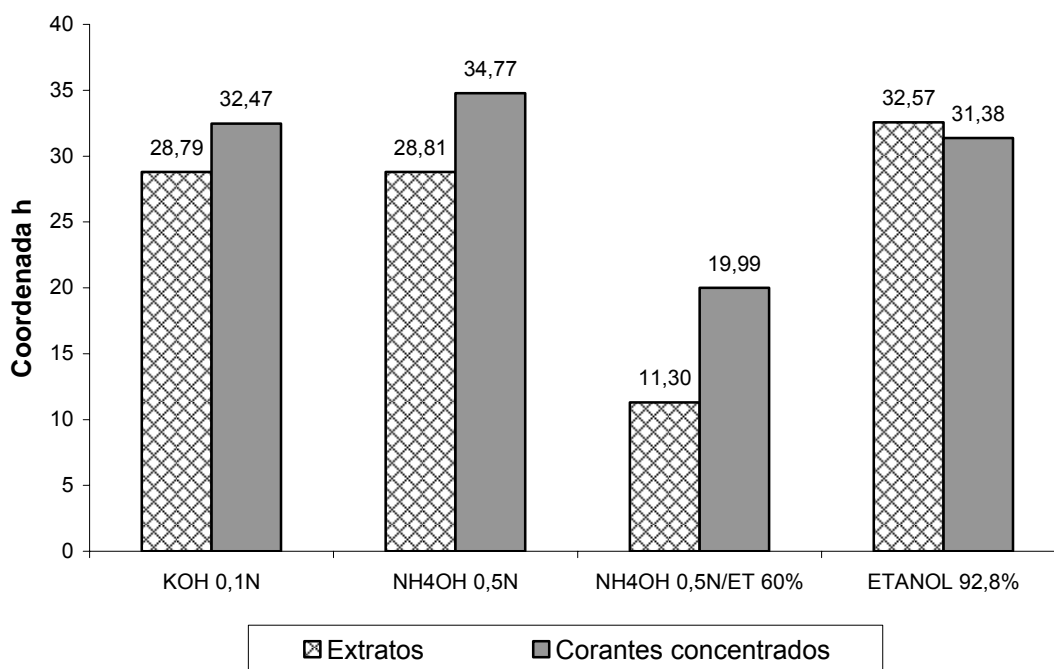


Figura 7: Valores da coordenada “h” para os diferentes solventes nos extratos e corantes concentrados.

Como a tonalidade (h) é uma grandeza que caracteriza a qualidade da cor, permitindo que estas sejam diferenciadas, nos processos de extração e produção de pigmentos em pó e em pasta, é desejado que “h” sofra variações mínimas, o que indicaria pouca variação na forma dos pigmentos presentes no meio.

De acordo com a Figura 7, o corante concentrado que apresentou menor variação na tonalidade, quando relacionado ao seu extrato imediatamente antes da concentração, foi aquele produzido por etanol comercial. Para os demais corantes produzidos, houve uma variação crescente de sua tonalidade, quando se comparou os extratos e os corantes concentrados. O corante que apresentou maior variação de “h” foi o produzido por NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, seguido daquele produzido por NH_4OH 0,5 N, o que não foi uma característica desejável, já que quando se produz industrialmente um corante em pó ou em pasta, objetiva-se que sua tonalidade seja o mais parecida possível com aquela obtida nos processos de extração.

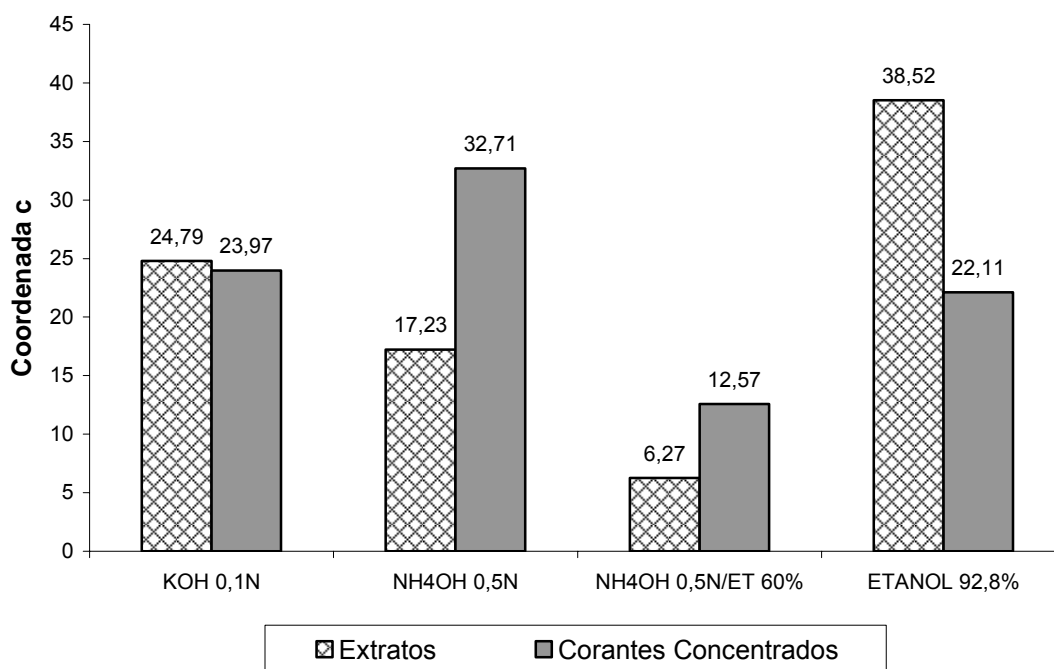


Figura 8: Valores da coordenada “c” para os diferentes solventes nos extratos e corantes concentrados.

De acordo com a Figura 8, observou-se que, com o processo de concentração dos extratos, estes apresentaram comportamentos distintos em relação à cromaticidade ou saturação (c). Enquanto nos corantes produzidos por KOH 0,1 N e por etanol comercial os valores de “c” declinaram nos respectivos corantes concentrados, naqueles produzidos por NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60% houve um aumento de “c”. O extrato que apresentou maior saturação da cor foi o produzido por etanol comercial. Já o corante concentrado que apresentou maior “c” foi o produzido por NH₄OH 0,5 N. Para este corante, o processo de concentração permitiu um aumento expressivo da saturação da cor.

Segundo CONSTANT (2003), a avaliação colorimétrica através dos valores triestímulus tem mostrado correlação com as respostas visuais humanas. Em se tratando de coordenadas colorimétricas, o desejado durante a extração de pigmentos é que se observe aumento da saturação da cor com um mínimo de variação na tonalidade, o que refletiria um aumento no conteúdo do pigmento sem variação da sua forma original, ou seja, sem aumento no conteúdo de produtos de degradação com colorações que alterariam a tonalidade do extrato.

Particularmente para extratos contendo pigmentos de urucum, o desejado é que se observe aumento da coordenada a^* , o que refletiria maior intensidade de vermelho, diretamente relacionada à maior extração da bixina, e valores menores de b^* , o que indicaria um menor teor de pigmentos de degradação e de outros carotenóides presentes nas sementes de urucum, possivelmente arrastados durante o processo de extração.

CARDARELLI et al. (2006) realizaram uma correlação, por meio de análise multivariada, entre o teor de bixina obtida por diferentes solventes orgânicos e entre as coordenadas colorimétricas de seus extratos. O teor de bixina correlacionou-se positivamente com a coordenada a^* ($r = 0,930$) e negativamente com b^* e L^* . Os extratos de bixina obtidos com as misturas metanol/água e etanol/água foram caracterizados pelo baixo teor de bixina e por serem mais claros e amarelados, o que foi indicado por valores mais elevados das coordenadas L^* e b^* . Já os extratos obtidos por metanol, etanol e acetato de etila apresentaram-se mais vermelhos (valor mais elevado da coordenada a^*) e com maior teor de bixina. Com isso, demonstrou-se a viabilidade da correlação entre análises qualitativas como a colorimetria com parâmetros quantitativos como teor de pigmentos.

3.4. Determinação da Curva de Cor versus pH

Após a extração, o pH inicial do extrato obtido com KOH 0,1 N foi 12,4. Em seguida, foi acidificado com solução de HCl 1,5 N até atingir 2,4, abrangendo dez valores de pH intermediários. O pH inicial do extrato obtido por NH_4OH 0,5 N foi de 10,3, e foi acidificado até atingir o valor de 2,4, nas mesmas condições anteriores.

As Figuras 9 e 10 mostram os valores das coordenadas luminosidade (L^*), intensidade de vermelho e verde (a^*) e intensidade de amarelo e azul (b^*) para os extratos obtidos com KOH 0,1 N (Figura 9) e NH_4OH 0,5 N (Figura 10). São mostrados também os valores de tonalidade (h) e saturação (c), calculados a partir das coordenadas iniciais, para cada extrato obtido.

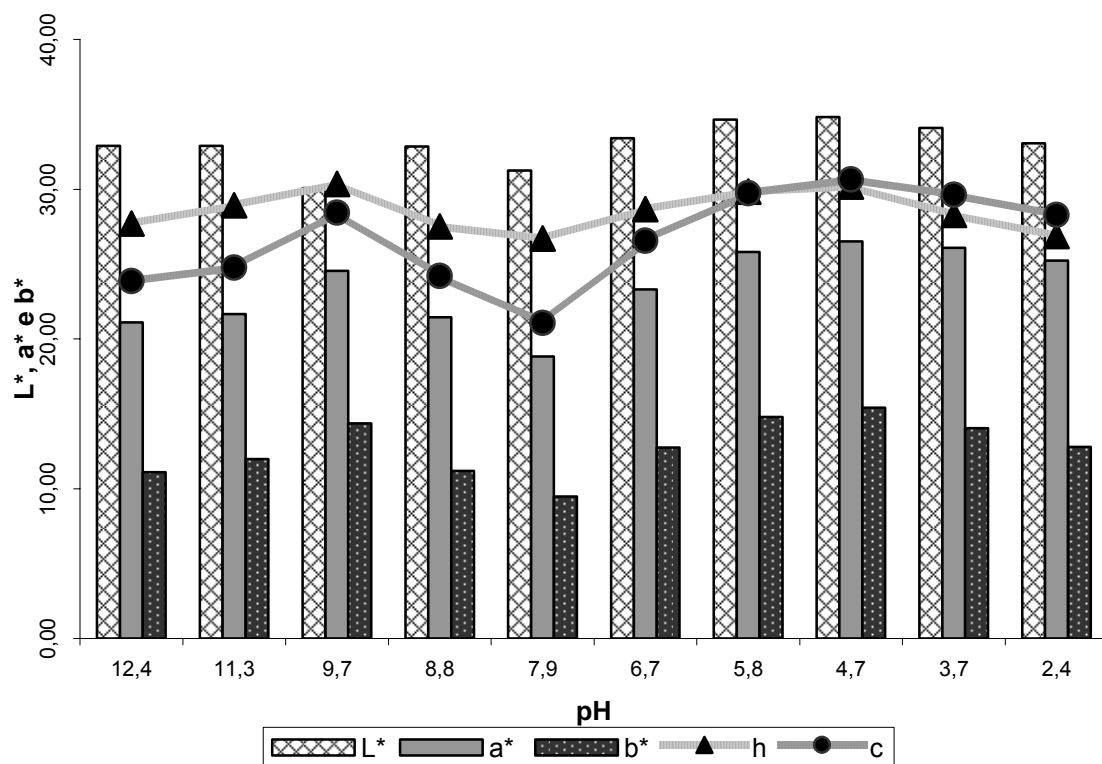


Figura 9: Variação das coordenadas L*, a* e b*, e de “h” e “c” em extratos de urucum obtidos com KOH 0,1 N a diferentes pH.

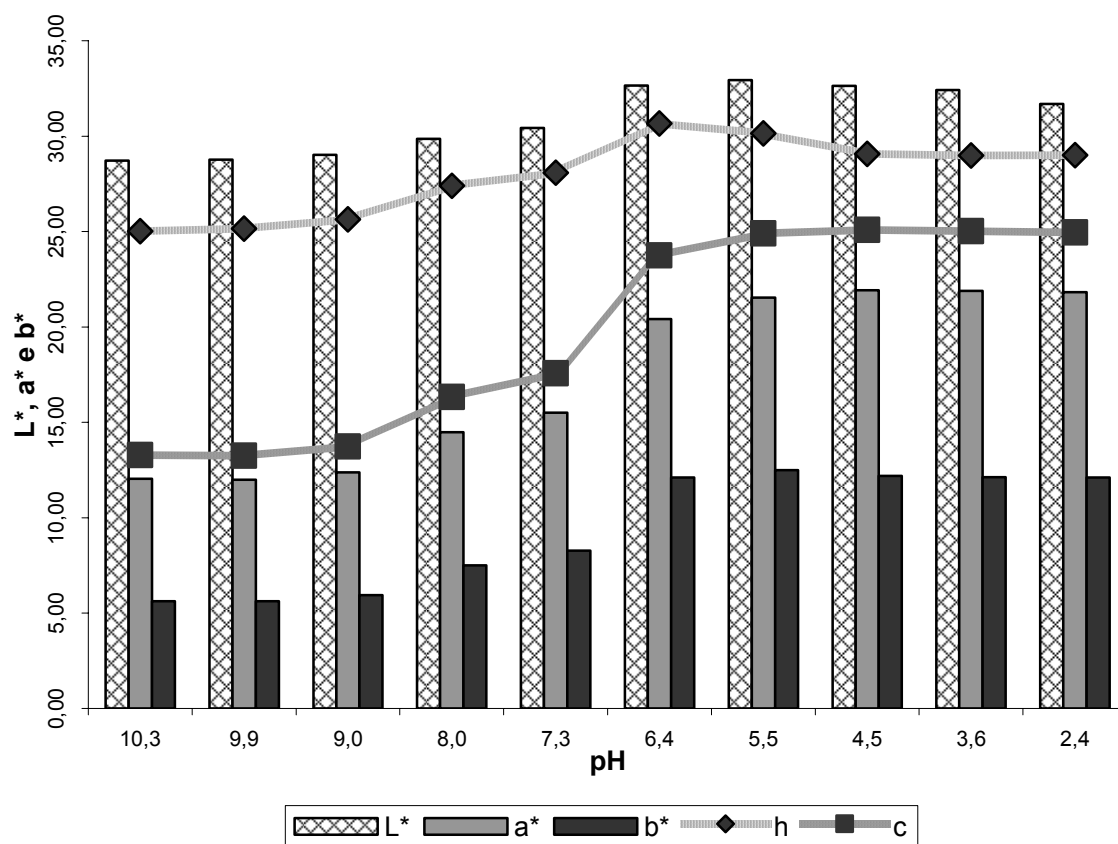


Figura 10: Variação das coordenadas L*, a* e b* e de “h” e “c” em extratos de urucum obtidos com NH₄OH 0,5 N a diferentes pH.

De acordo com as Figuras 9 e 10, em valores próximos ao pH inicial dos extratos, observou-se que o extrato obtido com KOH 0,1 N apresentou maior luminosidade (L^*), maior intensidade de vermelho (maior valor de a^*) e de amarelo (maior valor de b^*), e maiores valores de tonalidade (h) e saturação (c), comparado ao extrato obtido com NH_4OH 0,5 N. Perto da faixa de pH neutro, no extrato obtido com KOH 0,1 N, foram alcançados os menores valores das coordenadas colorimétricas. Já no extrato obtido com NH_4OH 0,5 N isto não se verificou, e os menores valores das coordenadas foram encontrados em pH mais alcalinos. Perto do pH 4,0, o extrato obtido com KOH 0,1 N ainda mostrou maiores valores das coordenadas colorimétricas, comparado ao extrato obtido com NH_4OH 0,5 N.

Os resultados demonstraram que a variação do solvente utilizado na extração e na possível conversão da bixina do urucum em norbixina, através de sua hidrólise, implicou em variação da cor dos corantes produzidos.

Como pôde ser visto, em corantes de urucum, as coordenadas de cor luminosidade (L^*), intensidade de vermelho e verde (a^*) e intensidade de amarelo e azul (b^*) variaram com o aumento ou diminuição do pH, bem como pelo tipo de solvente alcalino utilizado na extração.

A alteração do pH nos extratos do urucum influencia na forma como os pigmentos se apresentam. Em pH mais alcalinos, normalmente acima de 10,0, a bixina tende a ser saponificada, em maior ou menor extensão, dependendo do tempo de reação e do solvente extrator, originando o sal da norbixina. Entretanto, nessa faixa de pH, todas as formas de pigmentos possivelmente presentes como bixina, sal de bixina, norbixina e sal de norbixina encontram-se muito solúveis. Ao se proceder ao abaixamento gradual do pH, ao se atingir a faixa próxima à neutralidade ou a pH levemente ácido, nota-se que há um aumento dos valores das coordenadas colorimétricas, especialmente da cromaticidade ou saturação (coordenada c), conforme mostrado pelas Figuras 9 e 10. Em meio levemente ácido normalmente ocorre a precipitação dos sais norbixinato e bixinato, em suas formas norbixina e bixina, respectivamente, que são insolúveis no meio, nesta condição de pH. Com essa diminuição da solubilidade dos pigmentos, o extrato torna-se, de certa forma, mais turvo pela presença dos pigmentos

insolúveis, e o aumento da saturação da cor pode ser compreendido por este fato.

A variação das coordenadas colorimétricas em função do pH é uma informação útil na escolha do solvente alcalino a ser utilizado, bem como na determinação da faixa de pH a que o corante seria utilizado, de forma que seu padrão de cor fosse o mais uniforme possível.

4. CONCLUSÃO

Em termos da eficiência de extração dos pigmentos, o melhor solvente extrator foi o NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, que possibilitou o teor mais baixo de pigmentos residuais nas sementes. Já o etanol comercial, nestas condições, foi o solvente de menor eficiência.

Quanto ao teor de pigmentos, os solventes avaliados tiveram desempenhos semelhantes, exceto o etanol comercial, que apresentou menor poder extrator.

O maior teor de cinzas foi encontrado para o corante produzido com KOH 0,1 N. Os menores teores foram encontrados nos extratos produzidos com solventes de amônia.

Os diferentes solventes extratores influenciaram, também, no aumento da concentração de determinados compostos presentes nos corantes em pó e em pasta, como teores mais elevados de compostos nitrogenados ou maiores quantidades de potássio.

As análises colorimétricas possibilitaram a caracterização qualitativa e a diferenciação da cor de cada extrato e de cada corante concentrado produzido pelos diferentes solventes extratores. As coordenadas colorimétricas L^* , a^* e b^* variaram com o aumento ou diminuição do pH, bem como pelo tipo de solvente alcalino utilizado na extração.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS PIGMENTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) OBTIDOS POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Como a demanda para o urucum e outros corantes naturais tende a aumentar nos dias de hoje, especificações mais rigorosas quanto à composição destes produtos são impostas pelos organismos competentes. Um profundo conhecimento da química e bioquímica destes produtos é requerido, já que estes podem sofrer restrições de uso em determinadas classes de alimentos, pelo argumento de que há pouco conhecimento disponível sobre a composição de seus extratos (MERCADANTE et al., 1996).

No curso da extração e do processamento dos pigmentos de urucum, vários produtos de rearranjo ou de degradação podem ser formados. Por exemplo, aquecimento moderado pode causar a conversão da *cis*-bixina para seus isômeros *trans*. Um aquecimento mais drástico pode causar degradação da bixina, originando grande número de produtos, principalmente compostos de degradação de cadeia carbônica contendo 17 carbonos, conhecidos como C₁₇. A hidrólise alcalina feita sob condições controladas produz o ácido dicarboxílico livre norbixina, que, assim como a

bixina, pode existir em ambas as formas, *cis* e *trans* (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988).

Em laboratórios de garantia da qualidade, nas indústrias produtoras dos corantes de urucum e nas indústrias que utilizam estes aditivos, a análise mais importante e mais frequentemente realizada é a medida da concentração dos pigmentos nos extratos e formulações, através da medida espectrofotométrica da intensidade da cor. Com ela, tem-se a real concentração de pigmento do extrato e pode-se monitorar uma possível degradação do corante no extrato ou na formulação de interesse para se investigar suas causas.

A cromatografia em coluna e a cromatografia em camada delgada foram métodos historicamente empregados para isolamento e análises de muitos carotenóides. Contudo, os avanços das técnicas de espectroscopia, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa têm contribuído muito para a elucidação da estrutura destes compostos. Por outro lado, os constantes avanços da CLAE e da espectrofotometria têm contribuído de maneira significativa para o isolamento e quantificação destes pigmentos. Desta forma, a determinação do teor de bixina se faz normalmente por técnicas espectrofotométricas ou por cromatográfica líquida de alta eficiência. Não obstante, ambos os processos analíticos dependem de um padrão de referência de alta pureza (OLIVEIRA, 2005).

Particularmente no caso da bixina ou norbixina, devido à reduzida estabilidade à estocagem não se dispõe de um padrão analítico no mercado. Sendo assim, recorre-se à extração e purificação, com posterior caracterização e determinação da pureza do padrão obtido. Um aspecto determinante neste procedimento refere-se à técnica escolhida, normalmente a espectrofotométrica (OLIVEIRA, 2005; TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

O desenvolvimento de tecnologia que conduza não só à extração do pigmento bruto, mas principalmente que leve à obtenção de bixina de elevada pureza, conjugada à sua estabilização é de fundamental importância para agregar valor ao produto. Disponibilizar no mercado bixina de elevada pureza significa maior competitividade, e certeza de expansão comercial ao atender aos segmentos de maior tecnologia, como as indústrias

farmacêuticas. Vários trabalhos enfocam a separação e identificação dos compostos presentes no extrato de urucum. Entretanto, a maior parte deles explora particularmente aspectos analíticos, e não a otimização de um processo exclusivo para produção da bixina, o componente de maior valor econômico (OLIVEIRA, 2005).

Com base neste contexto, este capítulo teve o objetivo de purificar, identificar e quantificar pigmentos de urucum extraídos com diferentes metodologias, utilizando-se técnicas de análise espectroscópicas e cromatográficas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG e no Laboratório de Infravermelho, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa – MG.

2.1. MATERIAL

A matéria-prima empregada foi a semente do urucum (*Bixa orellana* L.), variedade Embrapa 36/37, adquirida no município de Teixeira de Freitas – BA, em fevereiro de 2006.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Obtenção dos Corantes de Urucum

Para a produção dos corantes de urucum foram utilizados os solventes de extração:

- solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 N;
- solução aquosa de hidróxido de amônio (NH₄OH) 0,5 N;
- etanol comercial (92,8%);
- hidróxido de amônio (NH₄OH) 0,5 N em etanol 60%.

A proporção semente:solvente utilizada foi de 1:6. As extrações se deram por uma hora, sob agitação, e à temperatura ambiente.

Na produção de corantes a partir dos solventes aquosos alcalinos KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, as sementes foram pesadas (100 g), e submetidas à extração. Os extratos foram, então, filtrados, a fim de separar impurezas, e tiveram seu pH corrigido para 8,0 com a adição de solução de ácido cítrico saturado. Em seguida, foram adicionados de maltodextrina até que se atingissem 16,5% de sólidos totais e foram submetidos ao aquecimento até que atingissem a temperatura de 40 °C. Os extratos, que poderiam conter norbixinato de potássio ou amônio (de acordo com o solvente de extração utilizado), passaram então pela secagem por atomização em “spray-dryer”. Após a secagem, os corantes na forma de pó obtidos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados em freezer (-18 ± 2 °C).

Na produção do corante de urucum a partir do solvente alcoólico alcalino NH₄OH 0,5 N em etanol 60%, as sementes foram pesadas (100 g), e submetidas à extração. O extrato foi, então, filtrado a vácuo, a fim de separar impurezas, que foram descartadas. O extrato filtrado, que poderia conter norbixinato de amônio, foi acidificado com solução de ácido cítrico saturado até que fosse atingido o pH 3,5, para a precipitação da norbixina. O extrato acidificado foi mantido em repouso durante 12 horas para que ocorresse a decantação da norbixina no fundo do recipiente. A “massa” corante obtida foi recuperada e submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 45 °C, durante 30 minutos. O corante em pasta obtido foi acondicionado em saco de polietileno de alta densidade, e armazenado em freezer.

Na produção do corante de urucum a partir do etanol comercial, as sementes foram pesadas (100 g), e submetidas à extração. O extrato foi colocado em recipiente de vidro para que precipitasse durante 4 horas. Após a separação, a fase superior (sobrenadante) foi eliminada e a fase inferior (pigmento) foi recuperada. O pigmento foi submetido à secagem rápida em estufa de circulação forçada de ar a 45 °C por 30 minutos. A “massa” corante obtida foi, então, acondicionada em sacos de polietileno de alta densidade, e armazenada em freezer (-18 ± 2 °C).

2.2.2. Identificação e Caracterização dos Pigmentos nos Corantes Produzidos

2.2.2.1. Análise por Espectroscopia de Infravermelho

Os corantes de urucum em pó e em pasta obtidos a partir dos solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial foram submetidos à análise por espectroscopia de infravermelho utilizando um espectrômetro infravermelho da marca Perkin-Elmer, modelo FT – IR 1000.

Os espectros no infravermelho dos corantes foram obtidos a partir de pastilhas de KBr contendo 1% da amostra (1 mg da amostra/100 mg de KBr), conforme realizado por PIMENTEL (1995), e obtidos na faixa de 4.000 a 500 cm⁻¹.

2.2.2.2. Análise por Espectrofotometria UV/Visível

Os corantes de urucum em pó e em pasta obtidos a partir dos diferentes solventes de extração foram diluídos adequadamente e tiveram seus espectros de absorção obtidos na região dos comprimentos de onda de 400 nm até 550 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601PC.

O corante em pasta obtido com o etanol comercial foi diluído em clorofórmio, de acordo com metodologia utilizada por TOCCHINI e MERCADANTE (2001).

Os corantes em pó obtidos pelos solventes KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N e o corante em pasta obtido pelo solvente NH₄OH 0,5 N em etanol 60% foram diluídos em KOH 0,5%, conforme CHRISTIAN HANSEN (2000b).

2.2.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

2.2.2.3.1. Preparo das Amostras de Corantes Concentrados

O perfil cromatográfico dos corantes de urucum em pó e em pasta produzidos pelos diferentes métodos de extração foi determinado utilizando-se a CLAE.

Os corantes em pó produzidos pelos solventes aquosos KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N foram pesados (10 a 20 mg) e dissolvidos em 20 mL da mistura água:tetrahidrofurano:acetonitrila (2:1:1), previamente avaliada.

Os corantes em pasta produzidos pelos solventes alcoólicos NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial foram pesados (10 a 20 mg) e dissolvidos em 35 mL da mistura tetrahidrofurano:acetonitrila:*tert*-butil metil éter (3:3:1), previamente avaliada. As amostras, após preparadas, foram todas filtradas em membrana Filtro Milipore Nylon, com diâmetro de poro de 0,2 µm, e injetadas no sistema CLAE.

O sistema solvente selecionado para ser utilizado neste trabalho foi a mistura acetonitrila:ácido acético 5% (75:25), baseado em BARETH et al. (2002). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 AD VP detector UV-Visível e integrador-processador Shimadzu SCL-10A VP, com duas bombas e sistema manual de injeção, de 50 µL de amostra. Utilizou-se coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (25 cm × 4,0 mm; 5 µm) marca Merck, protegida por uma pré-coluna CLC G-ODS (Shimadzu). O fluxo foi de 1 mL/min e os espectros foram adquiridos no comprimento de onda de 460 nm. O volume de amostra injetado foi de 50 µL.

Os picos correspondentes à bixina e à norbixina foram identificados através do comportamento cromatográfico, comparados aos padrões, e pela comparação dos espectros no UV/visível com aqueles fornecidos na literatura.

2.2.2.3.2. Preparo dos Padrões

Para a identificação e quantificação cromatográfica dos pigmentos presentes nos corantes em pasta e em pó foram purificadas a bixina e a norbixina partindo-se de diferentes metodologias. Como os padrões de bixina e norbixina não estavam disponíveis no mercado, surgiu a necessidade de se isolar os componentes principais a partir das sementes do urucum. Foram utilizadas as metodologias com base em TOCCHINI e MERCADANTE (2001) e em BAHL et al. (1971).

2.2.2.3.2.1. Padrão de Bixina

Para a bixina, de acordo com TOCCHINI e MERCADANTE (2001), foi realizada a extração em metanol:diclorometano (1:1), de sementes de urucum previamente lavadas com éter de petróleo. Após a concentração em evaporador rotatório, o extrato foi purificado por sucessiva cromatografia em camada delgada de sílica-gel, com as fases móveis acetato de etila:éter de petróleo (3:2) e metanol:diclorometano (1:1), totalizando quatro corridas cromatográficas.

De acordo com BAHL et al. (1971), as sementes foram extraídas a quente com acetato de etila e o extrato foi concentrado em evaporador rotatório. Em seguida, foi adicionado ao extrato, éter de petróleo. A bixina decantada foi recolhida e eluída em placas de sílica-gel com a fase móvel clorofórmio:metanol (94:6).

2.2.2.3.2.2. Padrão de Norbixina

Para a norbixina, seguindo a metodologia de TOCCHINI e MERCADANTE (2001), após a concentração do extrato obtido com metanol:diclorometano (1:1), juntou-se à solução uma parte de KOH 10% e deixou-se à temperatura ambiente, por uma noite, ao abrigo da luz. Desta maneira, garantiu-se a saponificação da bixina, originando os sais de norbixina. A esta mistura foi acrescentado ácido acético para neutralização e precipitação da norbixina. O padrão foi purificado por sucessiva

cromatografia em camada delgada de sílica-gel com acetato de etila (100%) como fase móvel e pela adição gradual de metanol até o padrão ser recolhido em metanol 100%, totalizando cinco corridas cromatográficas.

2.2.2.3.3. Quantificação dos Pigmentos por CLAE

Para a quantificação dos pigmentos de urucum, foram injetados no sistema CLAE os padrões de bixina e de norbixina em concentrações distintas. Em seguida, foram traçadas as curvas analíticas da bixina e da norbixina, que foram lineares nas faixas de concentração injetadas, apresentando coeficientes de correlação (R^2) de 0,986 (bixina) e 0,981 (norbixina). A quantificação dos pigmentos foi feita pela comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas dos padrões injetados. Os corantes a serem quantificados foram submetidos à CLAE em três repetições.

De posse dos dados da quantificação dos pigmentos por meio da CLAE, compararam-se os valores obtidos pela cromatografia com aqueles obtidos pela quantificação dos pigmentos por espectrofotometria, conforme exposto no item 2.2.4.2. do Capítulo 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação e Caracterização dos Pigmentos nos Corantes Produzidos

3.1.1. Análise por Espectroscopia de Infravermelho

As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os espectros no infravermelho dos corantes em pó e em pasta extraídos com o KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial.

Com base nas análises dos espectros no infravermelho dos corantes, constatou-se que em todos ocorreram absorções que são peculiares das duplas conjugadas, de grupos carbonílicos e da hidroxila, grupamentos funcionais presentes na molécula da bixina e da norbixina, semelhante ao encontrado por SOUZA (2000) e PIMENTEL (1995).

As Figuras 1 e 2 apresentaram espectros semelhantes. Próximo ao número de onda de 3.380 constatou-se uma absorção referente à hidroxila. Próximo a 2.927 e a 1.400, notou-se a presença de grupos CH₂/CH₃. Já nas regiões próximas a 1.153, 1.079 e 1.023, observou-se presença do grupamento C-O, de natureza ácida, o que indicaria a presença da bixina, que é um éster metílico derivado de um ácido dicarboxílico.

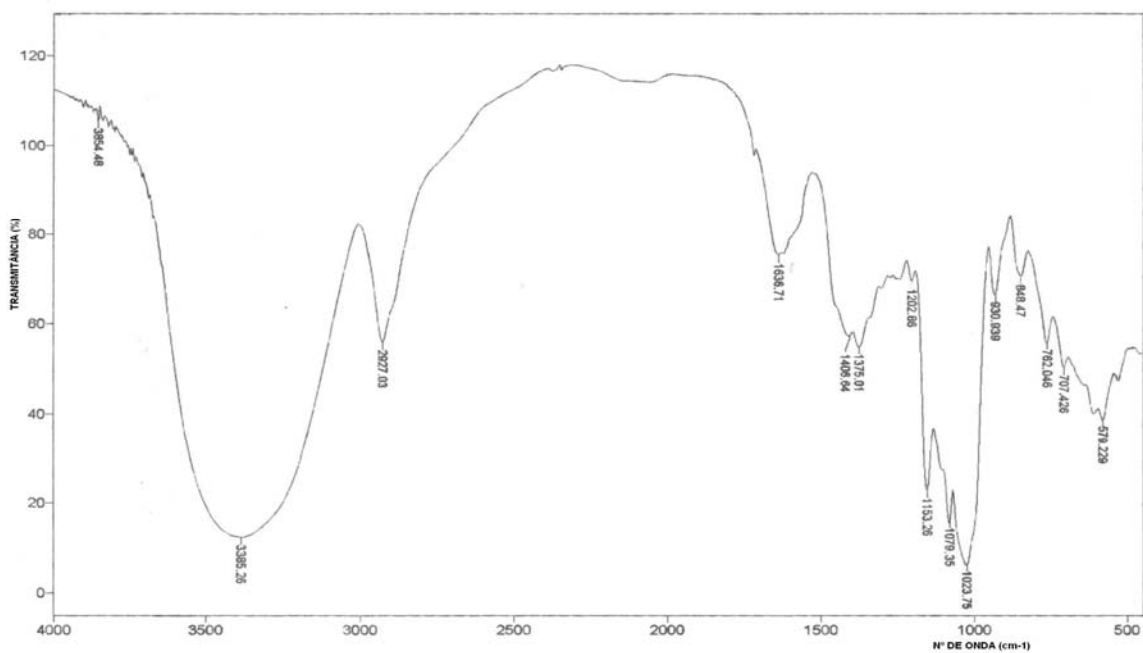


Figura 1: Espectro no Infravermelho (KBr) do corante em pó produzido pela extração com KOH 0,1 N e secagem em “spray-dryer”.

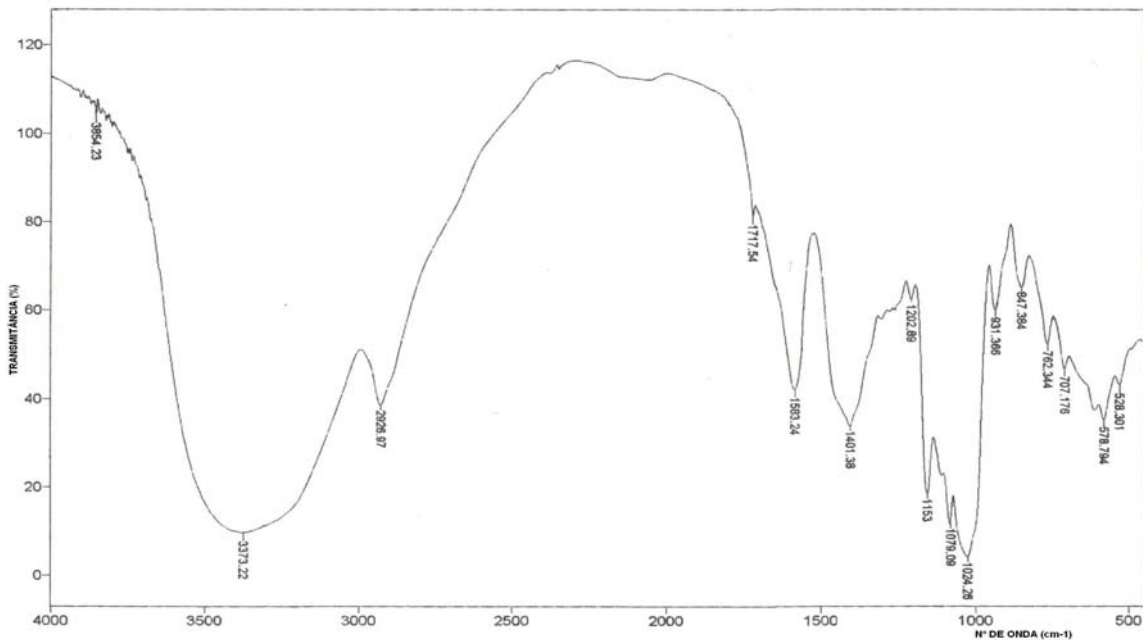


Figura 2: Espectro no Infravermelho (KBr) do corante em pó produzido pela extração com NH₄OH 0,5 N e secagem em “spray-dryer”.

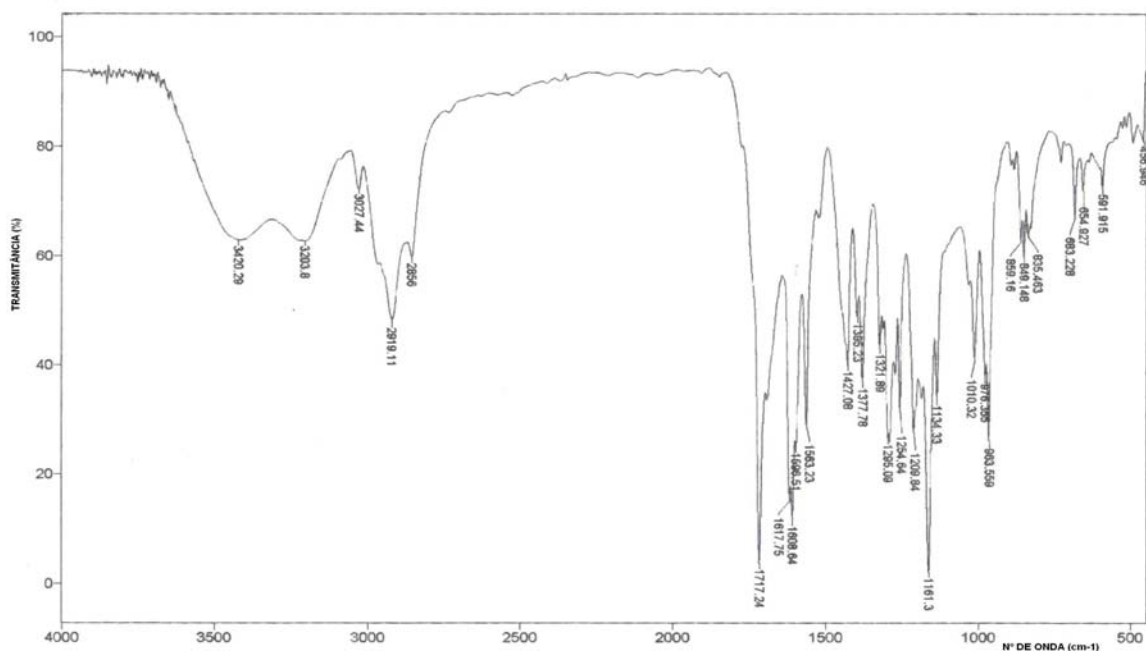


Figura 3: Espectro no Infravermelho (KBr) do corante em pasta produzido pela extração com o NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e precipitação ácida.

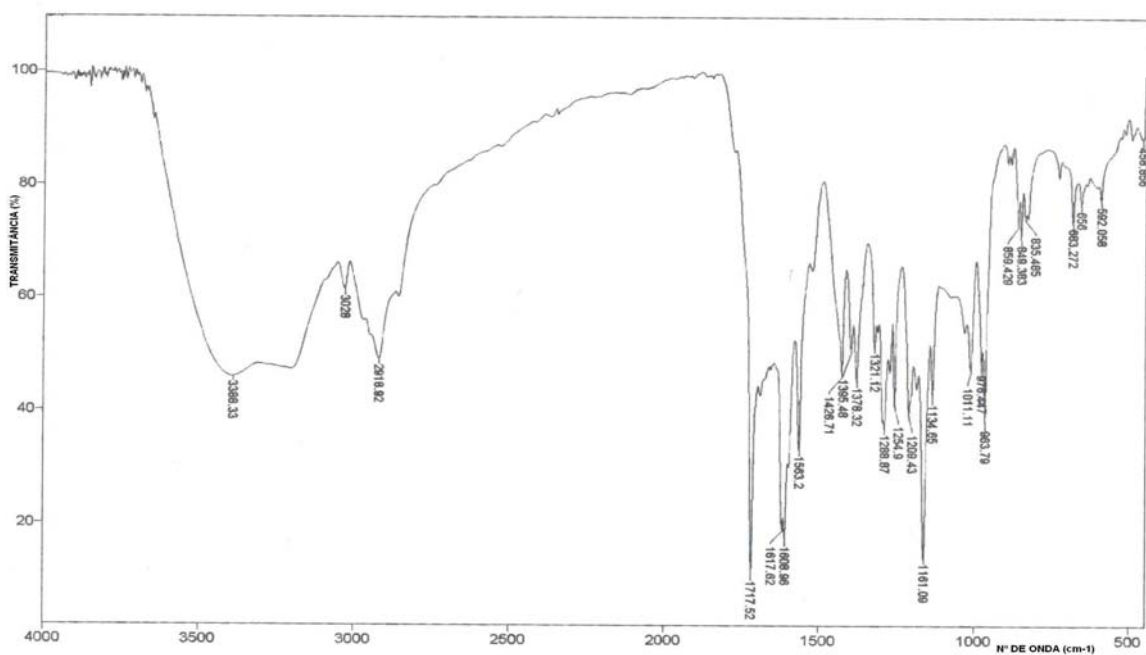


Figura 4: Espectro no Infravermelho (KBr) do corante em pasta produzido pela extração com o etanol comercial e secagem em estufa.

As Figuras 3 e 4, por sua vez, apresentaram espectros semelhantes. Nas regiões de 3.203, 3.388 e 3.420, constatou-se a presença de amina primária, o que estaria de acordo, possivelmente, com o sal obtido pelo solvente de extração NH_4OH 0,5 N em etanol 60% (bixinato ou norbixinato de amônio), como mostrado na Figura 3. Já na Figura 4, a presença da amina primária poderia ser explicada por algum interferente, já que na extração com o etanol comercial não se formaria o sal de amônio. Próximo a 2.919 observou-se a presença de grupos CH_2/CH_3 . Na região de 3.027, notou-se a presença de um grupamento H-C= (alqueno), presente na molécula de bixina. Pela Figura 3, na região de 1.717, observou-se a presença de um grupamento C=O . O perfil das absorções evidenciou a presença da bixina nestes corantes.

De acordo com PIMENTEL (1995), a presença do grupo funcional éster característico da bixina pôde ser identificada pela presença de uma banda intensa próxima a 1.720 cm^{-1} , e essa absorção foi verificada, em maior ou menor extensão, nos corantes avaliados.

3.1.2. Análise por Espectrofotometria UV/Visível

Como os carotenóides não apresentam absorção nos comprimentos de onda da região correspondente a ultravioleta, os espectros de absorção dos corantes concentrados de urucum em pó e em pasta foram adquiridos na região do visível e são mostrados nas Figuras 5 e 6.

De acordo com as Figuras 5 e 6 pôde-se observar que todos os corantes apresentaram absorção típica de carotenóides, com a presença de três picos de absorção máxima. O primeiro pico (partindo-se do menor comprimento de onda em direção ao maior), exceto para o corante produzido pelo etanol comercial, foi apenas um ponto de inflexão entre 420-440 nm, na curva espectral. Para o corante produzido com etanol comercial e em solução de clorofórmio para a leitura espectrofotométrica (Figura 6), o primeiro pico encontrou-se em 444 nm.

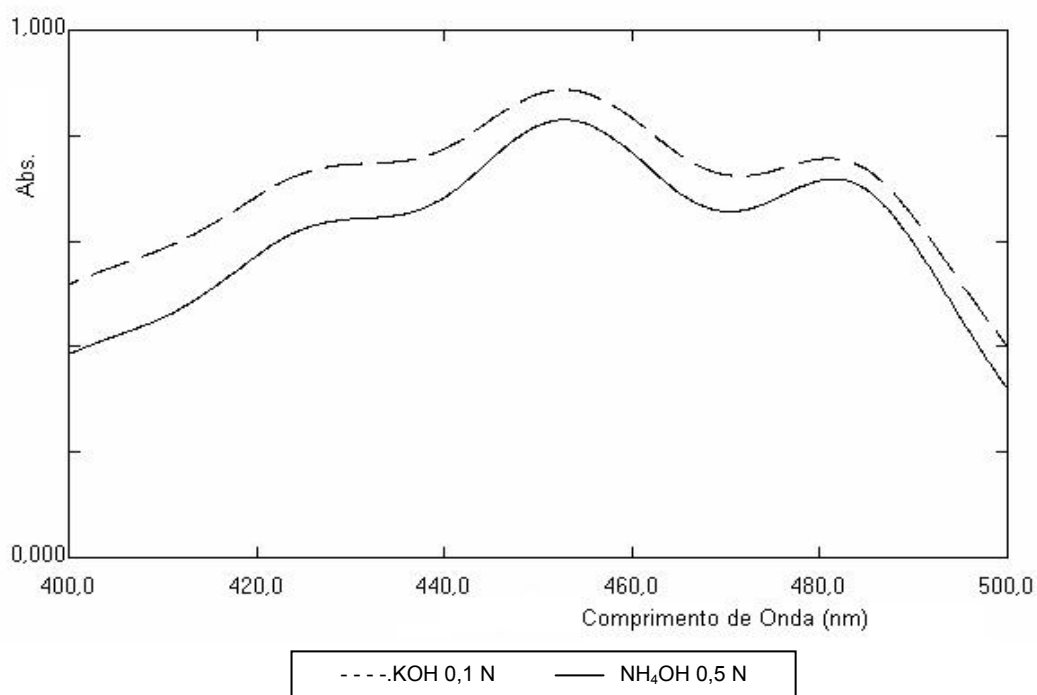


Figura 5: Espectros de absorção dos corantes em pó produzidos pelos solventes aquosos alcalinos (KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N).

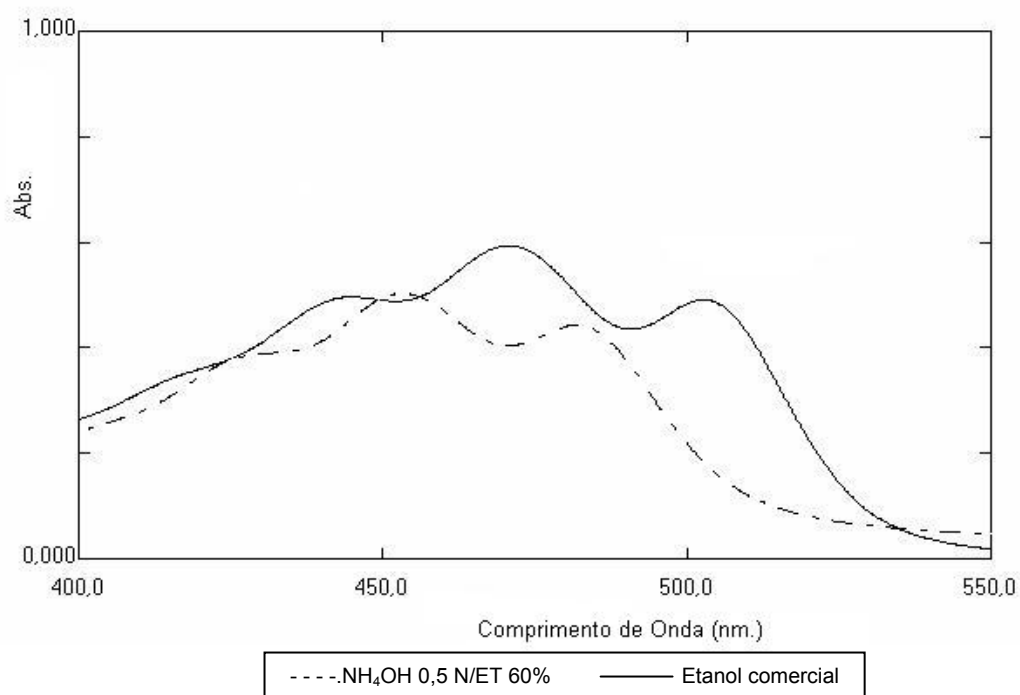


Figura 6: Espectros de absorção dos corantes em pó produzidos pelos solventes alcoólicos (NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial).

O pico principal dos pigmentos bixinóides é o segundo pico (partindo-se do menor comprimento de onda em direção ao maior), normalmente sendo o maior e o mais bem definido dos três. Para os corantes produzidos pelos solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60%, todos em solução de KOH 0,5% para leitura espectrofotométrica, o segundo pico encontrou-se próximo a 453 nm. Já para o corante produzido pelo etanol comercial e em solução de clorofórmio, o segundo pico foi localizado em 470 nm.

O terceiro pico, um pico menor, mas também bem definido, para os corantes produzidos pelos solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60%, localizou-se de 480 a 482 nm. Para o corante produzido pelo etanol comercial, este pico encontrou-se em 502 nm.

As soluções utilizadas (KOH 0,5% e clorofórmio) para a diluição dos corantes com vistas à varredura espectrofotométrica foram escolhidas baseadas na premissa de que nos corantes obtidos com KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N e NH₄OH 0,5 N em etanol 60%, o pigmento predominante seria a norbixina, e no corante obtido por etanol comercial o pigmento seria a bixina.

A espectrofotometria UV/Visível possibilitou a obtenção do perfil característico de absorção em diferentes comprimentos de onda das amostras de corantes, indicando a classe de pigmentos que estão presentes. Para o caso de pigmentos de urucum, todos os carotenóides extraídos têm absorção em comprimentos de onda muito próximos. Os métodos espectrofotométricos, então, realizariam a quantificação dos pigmentos bixinóides totais da amostra, não separando os teores de bixina, de norbixina e de outros carotenóides extraídos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988).

Os picos de absorção encontrados neste trabalho foram semelhantes aos descritos na literatura. De acordo com LEVY e RIVADENEIRA (2000), para a bixina diluída em clorofórmio, os picos da *cis*-bixina são a 471 nm e 503 nm. Para a norbixina em NaOH 0,1 N, o segundo pico é a 453 nm e o terceiro a aproximadamente 482 nm.

3.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.1.3.1. Preparo dos Padrões

3.1.3.1.1. Padrão de Bixina

Conseguiu-se obter os padrões de bixina com graus de pureza acima de 97% seguindo as duas metodologias descritas por TOCCHINI e MERCADANTE (2001) e por BAHL et al. (1971). Entretanto, ambos os processos necessitavam de sucessivas corridas em cromatografia de camada delgada (no mínimo quatro corridas) para que a bixina pudesse ser isolada. Nas primeiras corridas, em ambas as metodologias, quatro bandas foram separadas, e a bixina (a banda mais forte), foi raspada da placa e eluída em seguida. O número de bandas nas corridas posteriores foi diminuindo, até que se obteve, nas últimas corridas para ambas as metodologias, uma única banda, correspondente à bixina, com uma cauda clara, que poderia ser algum de seus isômeros.

Em face do número de corridas cromatográficas necessário, do tempo demandado para o isolamento e, conseqüentemente, do maior tempo de exposição da bixina, cada vez mais pura e instável, à temperatura ambiente, decidiu-se modificar as metodologias, originando um novo método de isolamento da bixina.

No novo método, a bixina purificada foi diluída convenientemente na mistura solvente água:tetrahidrofurano:acetonitrila (2:1:1), para ser submetida à CLAE.

O perfil cromatográfico obtido pelo padrão de bixina encontra-se na Figura 7.

De acordo com a Figura 7, o padrão de bixina produzido pelo novo método apresentou-se com grau de pureza de 97,8%.

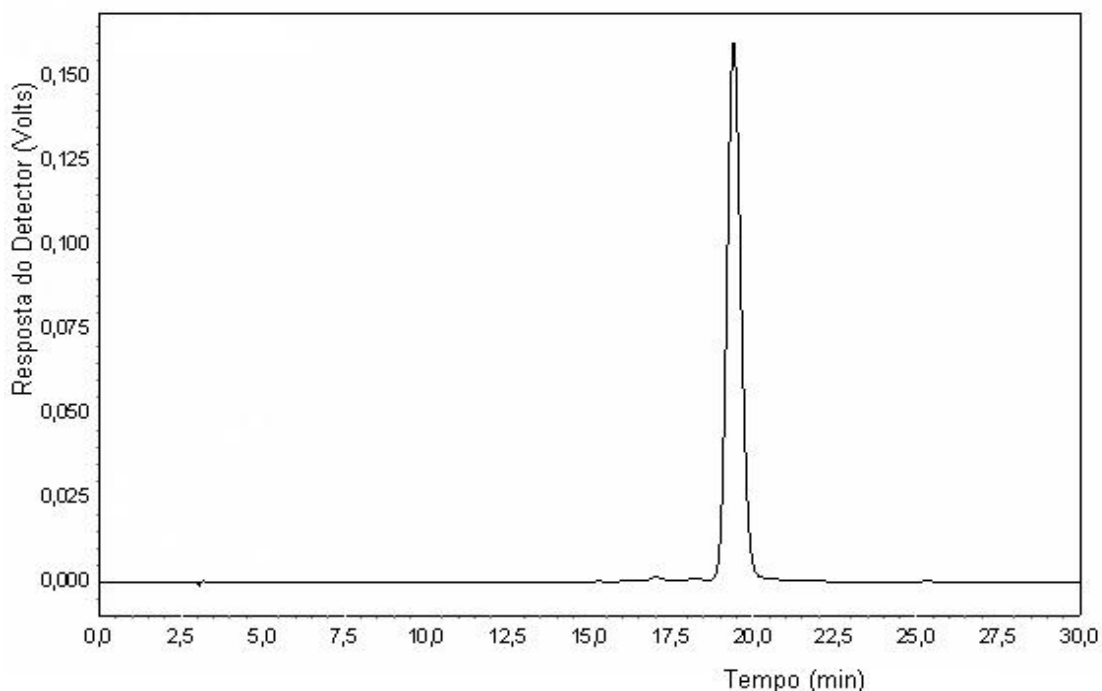


Figura 7: Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de bixina. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

Com isso, verificou-se a viabilidade do método desenvolvido para o isolamento da bixina. Além de uma menor demanda de tempo, foi mais econômico, quando comparado às metodologias analisadas neste trabalho, já que se obteve a bixina com elevado grau de pureza utilizando-se apenas uma etapa de cromatografia em camada delgada.

3.1.3.1.2. Padrão de Norbixina

Obtiveram-se os padrões de norbixina com graus de pureza acima de 89%, baseado na metodologia descrita por TOCCHINI e MERCADANTE (2001). Entretanto, o processo necessitou de cinco corridas cromatográficas em camada delgada para a purificação da norbixina. Na primeira corrida quatro bandas foram separadas, e a norbixina (a banda mais forte), foi raspada da placa e eluída em seguida. O número de bandas nas corridas posteriores foi diminuindo, até que se obteve, na última corrida, uma única banda, correspondente à norbixina, com uma cauda clara, que poderia ser algum de seus isômeros, de forma semelhante ao ocorrido com o padrão de

bixina. Similar ao encontrado por TOCCHINI e MERCADANTE (2001), foram encontrados cerca de 10% de isômeros no padrão, fato que explicaria seu menor grau de pureza, comparado ao conseguido para o padrão de bixina.

Entretanto, pelas mesmas limitações de tempo e de custos encontradas na fabricação do padrão de bixina, decidiu-se desenvolver um novo método de purificação da norbixina que fosse mais rápido, mais econômico e que, conseqüentemente, provocasse menor exposição do pigmento às condições deletérias do ambiente.

No novo método, a norbixina purificada foi diluída convenientemente utilizando-se a mistura água:tetrahidrofurano:acetonitrila (2:1:1), para ser submetida à CLAE.

O perfil cromatográfico obtido pelo padrão de norbixina encontra-se na Figura 8.

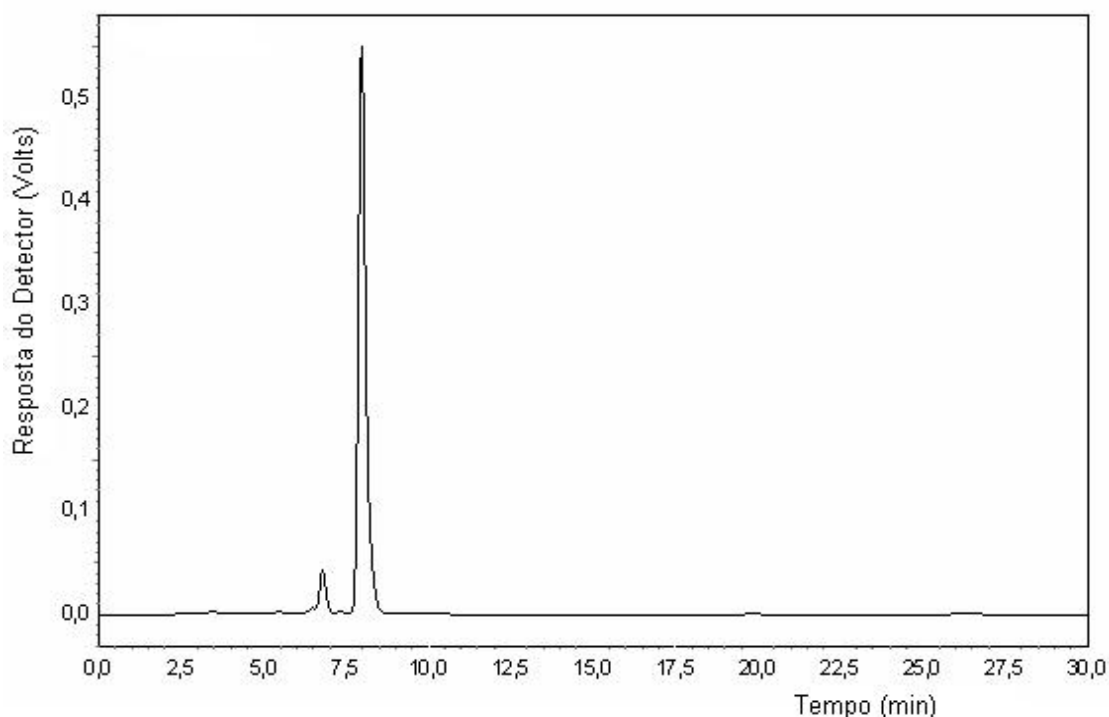


Figura 8: Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de norbixina. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

De acordo com a Figura 8, o padrão de norbixina produzido pelo novo método apresentou-se puro, com grau de pureza de 91,3%. Entretanto, foram feitas tentativas de se aumentar a pureza do padrão de norbixina, mas

não foram bem sucedidas. Notou-se, assim como na metodologia de TOCCHINI e MERCADANTE (2001), a presença de um composto isômero da norbixina, de cerca de 6 a 8% do padrão, cuja remoção não foi possível.

Com isso, de modo análogo ao observado para o padrão de bixina, verificou-se a viabilidade do método desenvolvido para o isolamento da norbixina. Além de uma menor demanda de tempo, foi também mais econômico, já que se obteve a norbixina com elevado grau de pureza. Ainda, não foi necessário o uso da cromatografia em camada delgada, o que se mostrou bastante vantajoso em termos de economia de tempo e material.

Diante das considerações anteriores, este foi o método escolhido para a obtenção dos padrões de norbixina a serem utilizados na confecção da curva analítica para a quantificação deste pigmento.

3.1.3.2. Identificação dos Corantes Concentrados por CLAE

A identificação dos carotenóides principais, a bixina e a norbixina, nos corantes em pó e em pasta, foi feita comparando-se os tempos de retenção da bixina e da norbixina obtidos nas soluções-padrão, comparados aos tempos de retenção destes compostos obtidos nas análises cromatográficas dos corantes.

As Figuras 9 e 10 mostram o perfil cromatográfico dos corantes em pó obtidos pelos solventes aquosos KOH 0,1 N (Figura 9) e NH₄OH 0,5 N (Figura 10).

De acordo com o cromatograma da Figura 9, observou-se que a bixina foi o carotenóide majoritário encontrado no corante em pó extraído com KOH 0,1 N. A bixina correspondeu a aproximadamente 89% dos carotenóides separados pela CLAE, enquanto a norbixina correspondeu a cerca de 2% dos pigmentos totais, apenas.

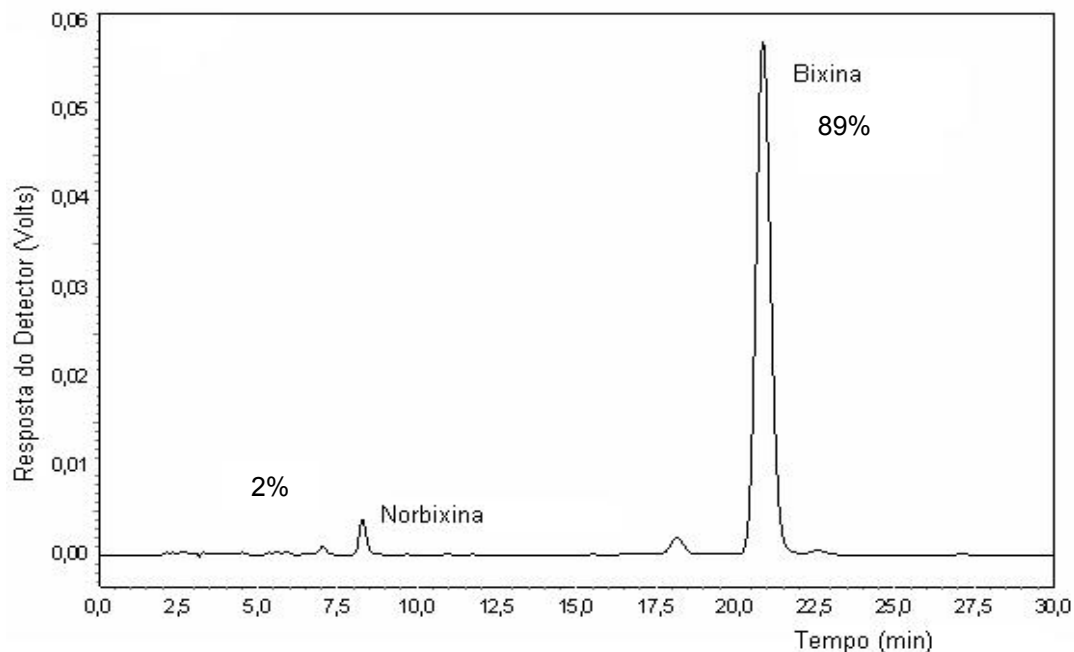


Figura 9: Cromatograma, obtido por CLAE, do corante em pó produzido por KOH 0,1 N. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

O resultado encontrado foi contrário ao esperado, já que é amplamente relatado na literatura que o pigmento proveniente da extração de pigmentos de urucum utilizando-se soluções aquosas alcalinas é o sal da norbixina. Este sal, o norbixinato, é oriundo da reação de saponificação do grupo éster da bixina, produzindo o ácido dicarboxílico livre, a norbixina, que em excesso de álcali, dissocia-se para formar o sal em questão.

Entretanto, na extração alcalina utilizando-se o KOH 0,1 N, mesmo com o pH de extração de 12,4, não houve a formação do sal de norbixina em quantidade significativa, sendo um indicativo de que a reação de saponificação poderia ser dependente do tempo de extração, da natureza do álcali e da temperatura de extração, dentre outros parâmetros.

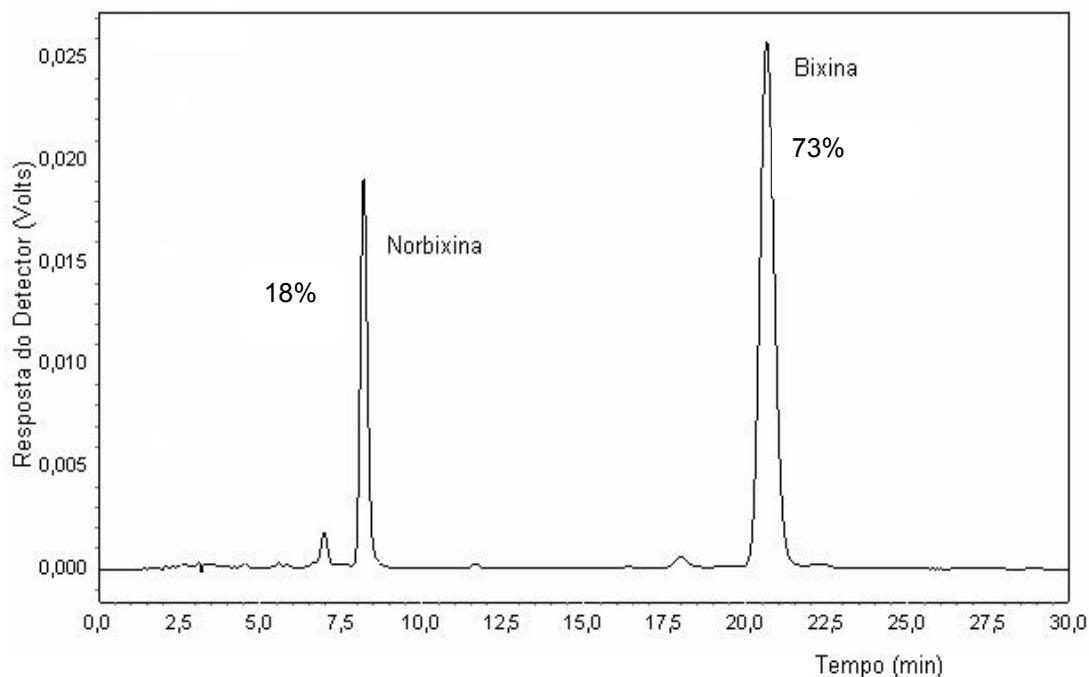


Figura 10: Cromatograma, obtido por CLAE, do corante em pó produzido por NH_4OH 0,5 N. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

De acordo com a Figura 10, observou-se que tanto a bixina quanto a norbixina foram extraídas com o NH_4OH 0,5 N. A bixina correspondeu a aproximadamente 73% dos pigmentos separados pela CLAE, enquanto a norbixina correspondeu a aproximadamente 18% dos pigmentos.

Verificou-se aqui saponificação parcial do grupo éster da bixina em sua forma hidrossolúvel, o sal da norbixina. Esta saponificação parcial obtida reforçou a hipótese da dependência da reação de saponificação em relação à natureza do álcali, à sua concentração e ao tempo de extração. As condições de extração dos pigmentos de urucum utilizado o KOH 0,1 N e o NH_4OH 0,5 N foram as mesmas, apenas se diferenciando os cátions das respectivas bases, a concentração delas e o pH de extração, que com o NH_4OH 0,5 N foi de 10,5. Os resultados distintos encontrados para os dois corantes poderiam ser um indicativo de que quanto maior a concentração do álcali, mais rápida seria a reação de saponificação.

Deve-se ressaltar aqui que durante a produção dos corantes em pó com os solventes KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N, após as etapas de extração,

os extratos líquidos foram acondicionados e armazenados em geladeira durante uma noite (aproximadamente 15 horas), sendo submetidos à secagem por "spray-dryer" apenas na manhã seguinte. Durante o tempo decorrido entre a extração até a atomização dos pigmentos, a reação de saponificação no meio poderia continuar ocorrendo, mesmo à temperatura de refrigeração. Isso poderia explicar, também, a maior intensidade de saponificação ocorrida para o corante produzido por NH_4OH 0,5 N, indicando que esta reação poderia ser dependente também do tempo de extração, aliado aos outros parâmetros já mencionados.

Notou-se, portanto, que apenas com o auxílio da CLAE foi possível identificar quais pigmentos foram extraídos e em qual proporção.

PRENTICE-HERNANDEZ et al. (1992) avaliaram o efeito do pH na quantidade de bixina produzida em extratos alcalinos de urucum. O pH ideal para a extração foi de 10,74 para uma pureza de 73,35% de bixina. Com a elevação dos valores de pH, houve uma queda drástica da bixina nos extratos. Os autores, ao analisarem os extratos por CLAE, observaram que em valores de pH menores que 11 (soluções extratoras de NaOH 0,2% e 0,3%), não houve formação de norbixina, mas somente de bixina. A partir de valores superiores a este pH (soluções extratoras de NaOH 0,4%, 0,5% e 0,6%), ocorreu a saponificação do grupo éster da bixina, formando a norbixina de forma irreversível. Este resultado diferiu daquele obtido neste trabalho, na medida em que um maior pH de extração (12,4, para a solução de KOH 0,1 N) não possibilitou a formação da norbixina, se comparado ao menor pH de extração (10,5, para a solução de NH_4OH 0,5 N), em que houve a saponificação parcial.

As Figuras 11 e 12 mostram o perfil cromatográfico dos corantes em pasta obtidos pela extração com os solventes alcoólicos NH_4OH 0,5 N em etanol 60% (Figura 11) e etanol comercial (Figura 12).

De acordo com o cromatograma da Figura 11, observou-se que a bixina foi o carotenóide majoritário encontrado no corante em pasta extraído com NH_4OH 0,5 N em etanol 60%. A bixina correspondeu a cerca de 90% dos carotenóides separados pela CLAE, enquanto a norbixina correspondeu a cerca de 2% dos pigmentos totais, apenas.

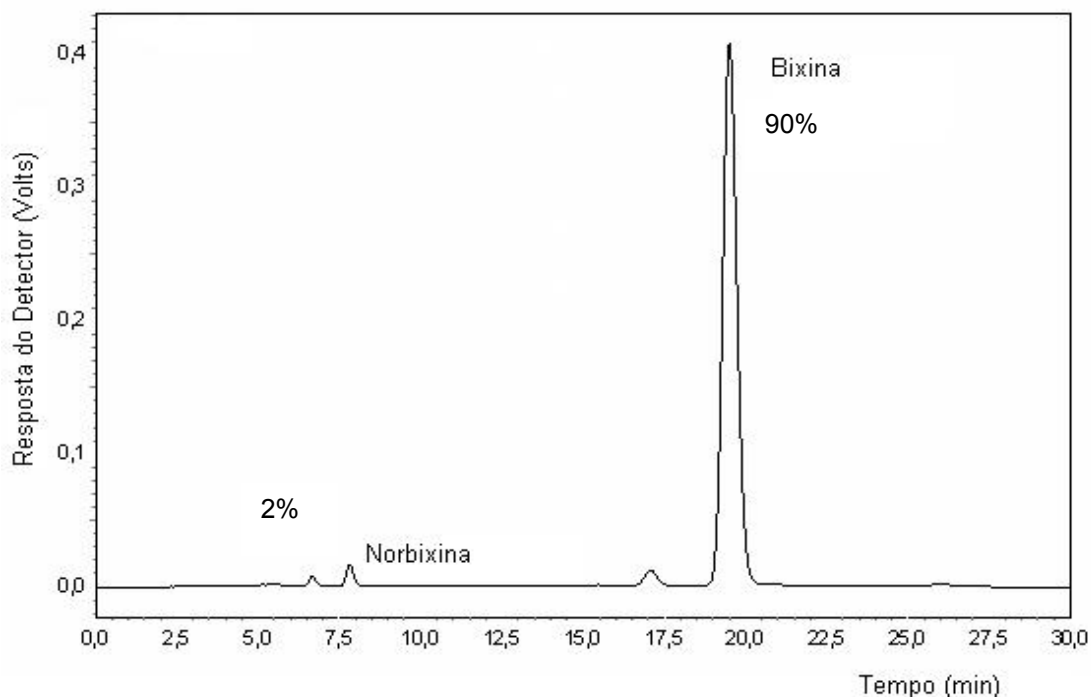


Figura 11: Cromatograma, obtido por CLAE, do corante em pasta produzido por NH_4OH 0,5 N em etanol 60%. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

Este resultado, também, pareceu contradizer os resultados descritos na literatura. Após a etapa de extração com o solvente alcoólico alcalino durante uma hora, o extrato foi acidificado até pH 4. Com isso, era de se esperar que, durante a extração, a bixina fosse saponificada e formasse o sal da norbixina. Com a acidificação, a norbixina precipitaria na forma de ácido dicarboxílico.

De acordo com o cromatograma da Figura 12, observou-se que a bixina foi o carotenóide majoritário encontrado no corante em pasta extraído com etanol comercial. A bixina correspondeu a aproximadamente 93% dos carotenóides separados pela CLAE, enquanto a norbixina correspondeu a aproximadamente 2% dos pigmentos totais, apenas.

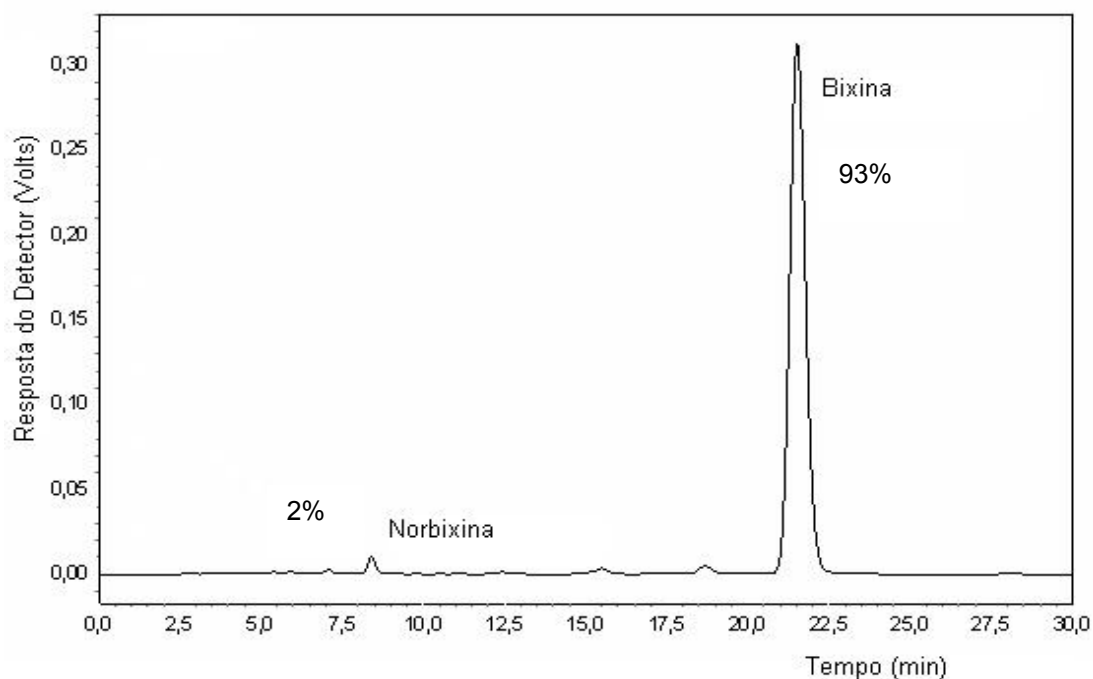


Figura 12: Cromatograma, obtido por CLAE, do corante em pasta produzido por etanol comercial. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

Este resultado foi esperado de ocorrer, já que a extração dos pigmentos de urucum com etanol é realizada em pH próximo à neutralidade. Portanto, a saponificação do grupamento éster da bixina para formar a norbixina, nesta condição, não ocorre, ou ocorre em quantidade insignificante, conforme mostrado pela Figura 12, sendo o carotenóide principal deste corante em pasta a bixina.

Notou-se, portanto, que a CLAE, por si só, poderia ser utilizada para fornecer uma indicação da proporção relativa de cada bixinóide em relação aos pigmentos totais, numa dada amostra. Esta informação seria útil, pois, quando se tem a informação de qual pigmento predominaria em um dado extrato (se bixina ou norbixina), poderia ser adotado o método mais adequado de quantificação espectrofotométrica.

3.1.3.3. Quantificação dos Pigmentos por CLAE

O Quadro 1 apresenta os teores médios de bixina e de norbixina, obtidos pela quantificação utilizando CLAE, dos corantes em pó e em pasta produzidos pelos solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial. É apresentada a soma dos teores de bixina e norbixina destes corantes, representando o teor de pigmentos bixinóides totais.

Quadro 1: Teores de bixina e norbixina dos corantes em pó e em pasta obtidos por CLAE, em base seca.

Solventes	Bixina (g/100 g)	Norbixina (g/100 g)	Bixinóides totais (g/100 g)
KOH 0,1N	1,11 ± 0,09*	0,16 ± 0,01	1,27 ± 0,10
NH ₄ OH 0,5N	0,99 ± 0,15	0,43 ± 0,07	1,42 ± 0,16
Etanol 92,8%	27,7 ± 1,00	1,08 ± 0,33	28,8 ± 1,40
NH ₄ OH 0,5N/Et.60%	19,4 ± 0,90	0,91 ± 0,25	20,3 ± 1,17

*Média ± desvio-padrão.

O Quadro 2 apresenta a comparação entre os teores médios de pigmentos bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, dos corantes em pó e em pasta produzidos pelos solventes KOH 0,1 N, NH₄OH 0,5 N, NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial. Para a quantificação por CLAE, é apresentada a soma dos teores de bixina e norbixina destes corantes, representando o teor de pigmentos bixinóides totais.

O teor de pigmentos por espectrofotometria foi obtido de acordo com o item 2.2.4.2. do Capítulo 1.

Quadro 2: Teores de bixina e/ou norbixina obtidos pelas metodologias de CLAE e espectrofotometria, em base seca.

Solventes	Bixinóides totais (g/100 g) - CLAE	Bixinóides totais (g/100 g) - Espectro	Varição** (%)
KOH 0,1N	1,27 ± 0,10*	1,19 ± 0,05	6,72
NH ₄ OH 0,5N	1,42 ± 0,16	1,59 ± 0,06	10,7
Etanol 92,8%	28,8 ± 1,40	33,5 ± 0,07	14,0
NH ₄ OH 0,5N/Et.60%	20,3 ± 1,17	20,5 ± 0,80	0,97

*Média ± desvio-padrão.

**Varição entre o percentual de pigmentos obtido por cromatografia em relação à análise espectrofotométrica (ALVES et al., 2006).

De acordo com o Quadro 2, observou-se, de forma comparativa, que as metodologias de quantificação de pigmentos por CLAE e por espectrofotometria retornaram resultados parecidos. A CLAE é o método mais preciso de quantificação de pigmentos, já que quantifica os pigmentos bixinóides de forma individualizada (bixina e norbixina separadamente). Já por espectrofotometria, são quantificados todos os pigmentos que absorvem na região do espectro considerada, neste caso de 400 a 550 nm. Com isso, são quantificados outros carotenóides juntamente com a bixina e a norbixina e, normalmente, os teores de pigmentos encontrados por métodos espectrofotométricos apresentam-se ligeiramente superiores àqueles encontrados por CLAE, conforme verificado neste trabalho para os corantes produzidos com etanol comercial, com NH₄OH 0,5 N e com NH₄OH 0,5 N em etanol 60%.

Há trabalhos na literatura comparando metodologias de CLAE e espectrofotometria na quantificação de pigmentos de urucum, e a maior parte deles apresenta boa correlação entre os dois métodos de quantificação (BARETH et al., 2002; SCOTTER et al., 1998).

Entretanto, ALVES et al. (2006), ao comparar percentuais de norbixina por CLAE e por espectrofotometria, consideraram elevada a variação entre os dois métodos. Ressaltaram que houve instabilidade dos resultados obtidos por CLAE em relação à análise espectrofotométrica, e que a análise quantitativa mais adequada seria a espectrofotometria, o que foi contrário ao encontrado neste trabalho.

Apesar de ter ocorrido variação relativamente elevada (14,0%) entre os dois métodos de quantificação para o corante em pasta obtido por etanol comercial, considerou-se que os dois métodos foram adequados à quantificação dos pigmentos de urucum. Ainda, como os resultados obtidos entre os métodos foram muito próximos, recomenda-se, para análises de rotina de quantificação de pigmentos totais, o uso do método espectrofotométrico, já que apresenta menor custo e é de rápida execução. Ao contrário, quando se necessita de informações a respeito da qualidade dos pigmentos, deve-se utilizar o método da CLAE, já que com ele pode ser detectada a presença de compostos de degradação, a relação entre a bixina e a norbixina e outros carotenóides presentes (SCOTTER et al., 1998).

4. CONCLUSÃO

Pela técnica de espectroscopia de infravermelho foi possível detectar a presença da bixina pelos seus grupamentos funcionais em todos os corantes avaliados.

Os corantes em pó e em pasta apresentaram espectro de absorção típico de carotenóides, com picos de absorção máxima condizentes com aqueles citados na literatura para os pigmentos de urucum.

As metodologias de purificação e isolamento da bixina e da norbixina desenvolvidas neste trabalho apresentaram-se eficientes, de menor custo, se comparadas às metodologias já existentes, de rápida execução, e proporcionaram compostos com pureza acima de 90%, representando uma alternativa viável de produção de padrões de bixina e norbixina.

As técnicas de CLAE identificaram satisfatoriamente os pigmentos presentes nos corantes de urucum e, graças a esta técnica, pôde-se observar o não desenvolvimento da reação de saponificação de bixina a norbixina, nas condições de extração do estudo. A bixina foi o componente majoritário da extração dos pigmentos de urucum quando se utilizou tanto os solventes aquosos alcalinos (KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N) quanto os solventes alcoólicos (NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial), representando acima de 70% de todos os pigmentos extraídos.

Os métodos de quantificação dos pigmentos de urucum por CLAE e por espectrofotometria retornaram resultados muito próximos de teores de pigmentos nos corantes em pó e em pasta, indicando que ambos os métodos são confiáveis e podem ser utilizados separadamente conforme a necessidade da análise.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE QUALITATIVA DOS FATORES QUE INFLUENCIAM A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO EM PIGMENTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

1. INTRODUÇÃO

Os corantes têm sido largamente utilizados como um meio de melhorar a aparência de alimentos, bebidas e cosméticos. O corante de urucum é utilizado extensivamente em suas várias formas, na indústria de alimentos, para tonalidades amarelas a vermelhas. 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, dentre outros (PRENTICE-HERNANDEZ et al., 1993; LIMA et al., 2001).

A bixina é o pigmento natural da semente do urucum, representando mais de 80% de todos os carotenóides presentes. A partir dela, são obtidos os demais pigmentos, como a norbixina, o sal da norbixina e os produtos de degradação térmica (CARVALHO, 1992). A bixina pode ser saponificada para formar um corante hidrossolúvel constituído pelo sal da norbixina. Ambas, bixina e norbixina, podem estar presentes em uma extração, e

podem também existir nas formas *cis* e *trans* (PRENTICE-HERNANDEZ et al., 1993).

O sal da norbixina é obtido pela extração alcalina (hidróxido de sódio ou de potássio) dos pigmentos da semente de urucum (CARVALHO, 1992, PIMENTEL, 1995). A bixina é um éster monometílico de um ácido dicarboxílico e, em condições alcalinas, o grupo metil pode ser saponificado, produzindo o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina. Em excesso de álcali, o ácido dicarboxílico dissocia-se para formar um sal, geralmente de potássio ou sódio, sendo esta forma de pigmento solúvel em água. 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). Ou seja, na extração dos pigmentos das sementes de urucum com solução aquosa alcalina em condições controladas, tem-se a hidrólise do grupamento éster do principal carotenóide bixina, dando origem ao sal de norbixina (norbixinato), solúvel no meio.

A grande demanda dos extratos de urucum com características de elevada qualidade tem acentuado as deficiências dos processos comuns usados para produzir os corantes, incluindo riscos de degradação térmica dos extratos e de oxidação dos pigmentos. Também, 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). Ainda, de acordo com o solvente e com o pH da extração utilizados, podem coexistir no meio as várias formas dos pigmentos.

Os dados analíticos disponíveis atualmente no que se refere ao conteúdo de pigmentos de urucum em formulações são essencialmente não-específicos, já que não apresentam detalhes da presença dos componentes corantes individuais. O conteúdo de corante normalmente é expresso em termos do componente majoritário, seja a bixina ou a norbixina e seus isômeros. Este fato é amplamente devido às falhas dos métodos analíticos disponíveis, que geralmente empregam técnicas espectrofotométricas diretas, que podem estar propensas a interferências. Pesquisas atuais em métodos de análise para pigmentos de urucum têm sido focadas largamente em formulações de urucum e sua estabilidade térmica, onde a evolução em

técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) permite a separação e a determinação dos isômeros geométricos majoritários e minoritários da bixina e da norbixina, bem como os principais produtos de degradação térmica (SCOTTER et al., 1998).

Com base neste contexto, e com base nos resultados inusitados encontrados no Capítulo 2 (item 3.1.3.2), durante a identificação dos pigmentos de urucum provenientes da extração alcalina, este capítulo teve o objetivo de analisar os fatores que possivelmente influenciariam a reação de saponificação de bixina a norbixina, durante a extração dos pigmentos de urucum, analisando os pigmentos principais extraídos, de forma individual e em conjunto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG.

2.1. MATERIAL

A matéria-prima empregada foi a semente do urucum (*Bixa orellana* L.), variedade Embrapa 36/37, adquirida no município de Teixeira de Freitas – BA, em fevereiro de 2006.

2.2. MÉTODOS

Este experimento foi realizado em face às dúvidas levantadas no Capítulo 2 (item 3.1.3.2), no tocante à extração alcalina, em que, nas condições avaliadas, era esperada a extração de norbixina e seu sal, ao invés da bixina. Assim, decidiu-se avaliar os fatores limitantes na conversão da bixina a norbixina, sob diferentes condições de extração, tais como: tempo e temperatura de extração, natureza e concentração do álcali.

Os fatores foram combinados de forma conveniente, à medida que se notavam resultados indicativos do andamento da reação de saponificação

no meio extrator. Para cada fator, foram avaliados os solventes de extração hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de amônio (NH₄OH).

Foram utilizadas técnicas de espectrofotometria UV/visível e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação dos pigmentos extraídos

Para a técnica de CLAE, a fase móvel selecionada foi a mistura acetonitrila:ácido acético 5% (75:25), baseado em BARETH et al. (2002). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 AD VP, detector UV-Visível e integrador-processador Shimadzu SCL-10A VP, com duas bombas e sistema manual de injeção. As amostras, após preparadas, foram todas filtradas em membrana Filtro Milipore Nylon, com diâmetro de poro de 0,2 µm, e injetadas no sistema CLAE.

Utilizou-se coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (25 cm × 4,0 mm; 5 µm) marca Merck, protegida por uma pré-coluna CLC G-ODS (Shimadzu). O fluxo foi de 1 mL/min e os espectros foram adquiridos no comprimento de onda de 460 nm. O volume de amostra injetado foi de 50 µL.

Para a identificação dos picos e quantificação dos pigmentos de urucum, foram utilizados os padrões de bixina e de norbixina previamente obtidos de acordo com o item 3.1.3.1. do Capítulo 2. Para a quantificação, foram obtidas as curvas analíticas da bixina e da norbixina, que apresentaram coeficientes de correlação (R^2) de 0,986 (bixina) e 0,981 (norbixina). A quantificação dos pigmentos foi feita pela comparação das áreas dos picos das amostras com as áreas dos padrões.

A utilização da espectrofotometria UV/visível para a quantificação da bixina e norbixina foi baseada nos trabalhos de SCOTTER et al. (1998), que utiliza duas metodologias descritas por SMITH et al. (1983), e recomendadas por RODRIGUEZ-AMAYA (1988), ao avaliar os métodos de detecção e quantificação de pigmentos de urucum. Por esta técnica, de posse do perfil cromatográfico das amostras, optou-se pelo solvente mais adequado à leitura espectrofotométrica. Quando o pigmento majoritário, identificado por CLAE, em determinada amostra era a bixina, de acordo com SMITH et al. (1983), a amostra foi diluída em uma solução de 3,7% de ácido acético em clorofórmio (v/v), de forma conveniente a se obter leitura

espectrofotométrica. A absorvância da solução diluída foi medida a 505 e 474 nm, e o conteúdo de bixina determinado por intermédio dos coeficientes de absorvância ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.790 (505 nm) e 3.130 (474 nm).

Da mesma forma, quando o pigmento majoritário em determinada amostra era a norbixina, ainda de acordo com SMITH et al. (1983), a amostra foi diluída em uma solução de 5% de ácido acético em clorofórmio. Em seguida, esta nova solução foi diluída 10 vezes com clorofórmio, para se obter uma solução final de 0,5% de ácido acético em clorofórmio. A absorvância da solução diluída foi medida a 503 nm e a 473 nm. O conteúdo de norbixina foi determinado por meio dos coeficientes de absorvância ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2.290 (503 nm) e 2.620 (473 nm).

2.2.1. Influência do Tempo de Extração na Reação de Saponificação

Neste ensaio, foram fixados os solventes KOH na concentração de 0,1 N e NH_4OH na concentração de 0,5 N, previamente utilizados como solventes extratores nos Capítulos 1 e 2, à temperatura de extração de 25°C.

Para a extração dos pigmentos de urucum, para cada amostra foram utilizados 50 g de sementes. Após a adição do solvente, as amostras foram submetidas à extração sob agitação constante. A relação semente:solvente utilizada foi de 1:6.

Tanto para o solvente KOH como para o NH_4OH as sementes foram extraídas por 24 horas. Optou-se por coletar dados intermediários à faixa de tempo avaliada, de acordo com o andamento da reação observado, uma vez que não havia o propósito de se comparar os solventes entre si. Para o solvente KOH 0,1 N foram coletados os dados dos tempos de 1, 2, 3, 4, 7 e 24 h. Para o solvente NH_4OH 0,5 N foram coletados os dados dos tempos de 30 minutos, 3, 5 e 24 h.

Para cada tempo de extração foram recolhidas duas alíquotas de 1mL de cada extrato. Uma das alíquotas foi recolhida em frasco âmbar, lacrado e imediatamente congelado, para as análises a serem realizadas posteriormente por espectrofotometria UV/Visível. Uma outra alíquota de 1 mL de cada extrato foi recolhida em frasco âmbar, diluída na mistura

tetrahidrofurano:acetonitrila:água (1:1:2), e imediatamente submetida a análise por CLAE.

As extrações foram feitas com três repetições.

2.2.2. Influência do Tempo de Extração e da Concentração dos Solventes na Reação de Saponificação

Neste ensaio, tanto para o solvente KOH como para o NH₄OH, foram avaliadas as concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5%, nos tempos de uma e duas horas de extração, para cada concentração avaliada. Para o KOH a temperatura de extração foi de 50 °C. Para o solvente NH₄OH, a temperatura de extração foi a ambiente (25 °C).

Para a extração dos pigmentos de urucum, para cada amostra foram utilizados 50 g de sementes. Após a adição do solvente, as amostras foram submetidas à extração sob agitação constante. A relação semente:solvente utilizada foi de 1:6.

Durante a extração, quando se atingia cada tempo a ser avaliado, eram recolhidas duas alíquotas de 1 mL de cada extrato, contendo o solvente de extração e o corante extraído. Uma das alíquotas era destinada à análise de espectrofotometria e a outra era destinada à análise por CLAE. As alíquotas recolhidas foram manipuladas de acordo com o descrito no item 2.2.1.

As extrações foram feitas com três repetições.

2.2.3. Influência do Tempo de Extração à Temperatura de 70 °C na Eficiência da Reação de Saponificação

Neste ensaio, foi fixada a temperatura de extração em 70 °C. As extrações foram realizadas durante uma e duas horas.

Para o solvente KOH utilizou-se a concentração de 0,1 N, e para o solvente NH₄OH utilizou-se a concentração de 0,5 N.

A extração dos pigmentos das sementes e as retiradas das amostras de extratos nos tempos definidos foram executadas conforme descrito no

item 2.2.1, e analisadas segundo os métodos de espectrofotometria UV/Visível e CLAE.

As extrações foram feitas com três repetições.

2.2.4. Influência de Diferentes Temperaturas de Extração na Reação de Saponificação

Neste ensaio, realizado para o solvente KOH, foram fixados a concentração da base em 4% e o tempo de extração em uma hora. Variaram-se as temperaturas em temperatura ambiente (25 °C), 50, 60 e 70 °C.

Este ensaio não foi realizado com o solvente NH₄OH, pela sua volatilidade e pela dificuldade em se manter um sistema fechado a temperaturas mais elevadas utilizando este solvente.

A extração dos pigmentos das sementes e as retiradas das amostras de extratos nos tempos definidos foram executadas conforme descrito no item 2.2.1, e analisadas segundo os métodos de espectrofotometria UV/Visível e CLAE.

As extrações foram feitas com três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência do Tempo de Extração na Reação de Saponificação

As Figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas obtidos pelas extrações com o KOH 0,1 N, à temperatura ambiente, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 7 e 24 horas.

Observa-se, de acordo com os cromatogramas, que o pigmento majoritário encontrado nos extratos foi a bixina, correspondendo a acima de 91% da área total dos picos de cada cromatograma. A norbixina correspondeu apenas a cerca de 2% da área total dos picos, e sua formação não foi aumentada em tempos maiores de extração.

Portanto, de acordo com as Figuras 1 e 2, não ocorreu a reação de saponificação de forma significativa nas condições de extração com KOH 0,1 N, à temperatura ambiente, mesmo em grandes períodos de tempo, como 24 h de extração. Baseado nestas observações notou-se que, nas condições de extração avaliadas (KOH 0,1 N à temperatura ambiente), a reação de saponificação não foi dependente do tempo de extração.

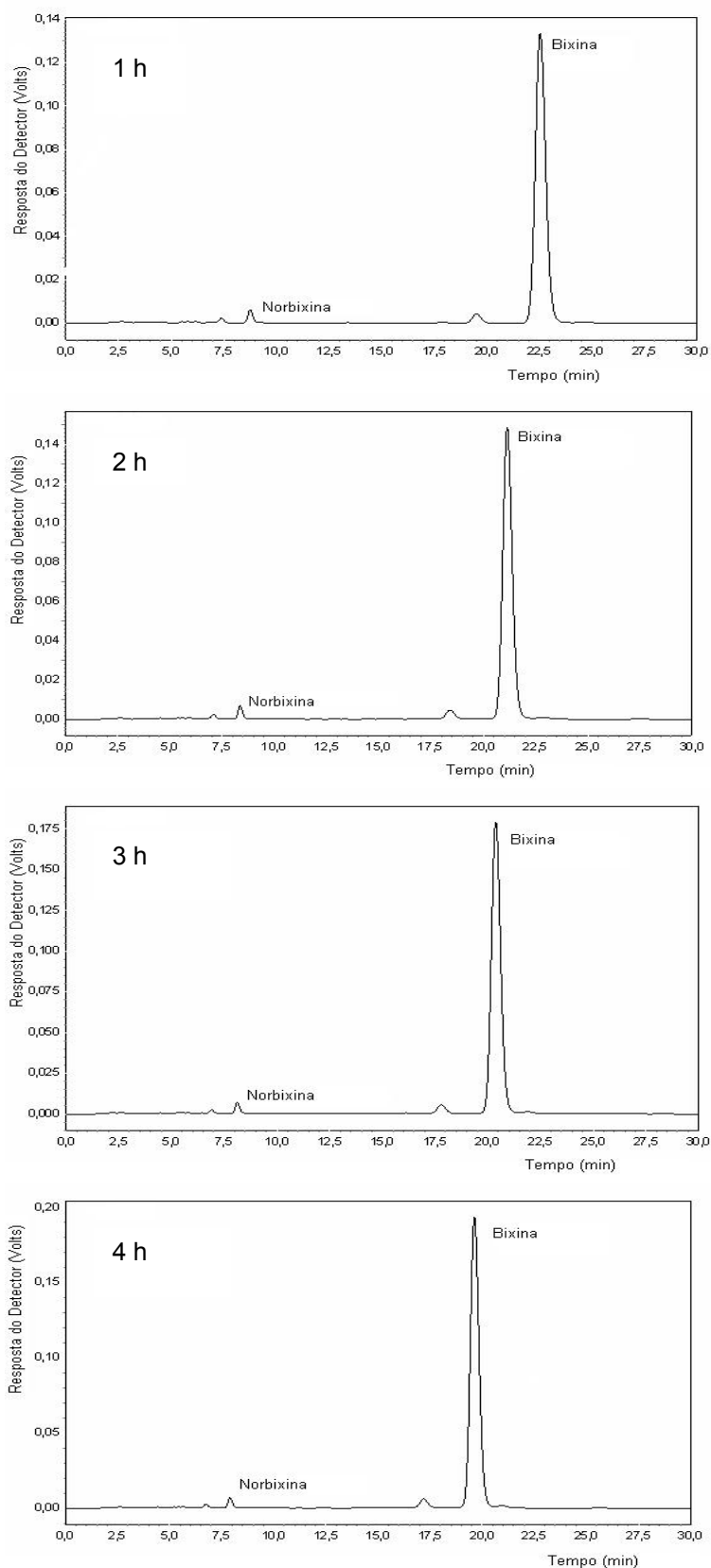


Figura 1: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH 0,1 N, à temperatura ambiente, de 1 a 4 horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

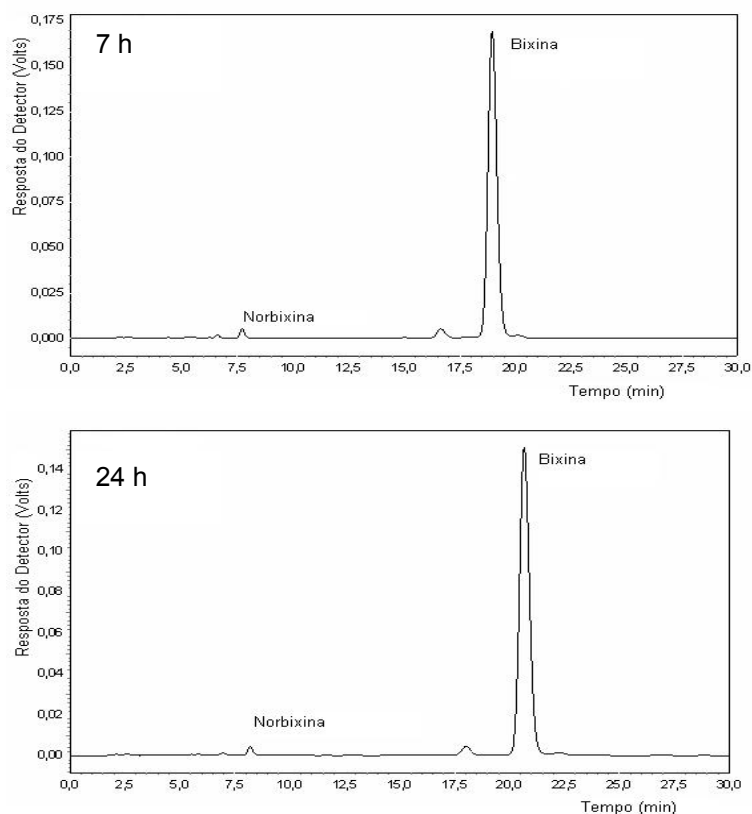


Figura 2: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH 0,1N, à temperatura ambiente, de 7 a 24 horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

A Figura 3 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, por CLAE, obtidos pela extração com KOH 0,1 N, à temperatura ambiente, nos diferentes tempos avaliados. A Figura 4 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).

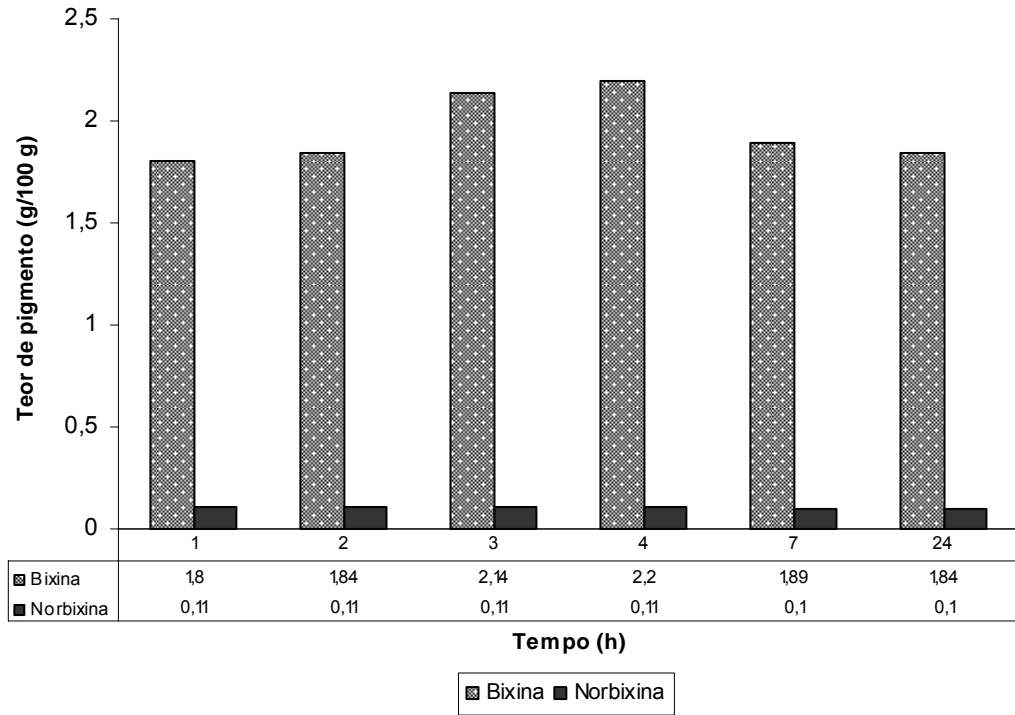


Figura 3: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com KOH 0,1 N à temperatura ambiente, de 1 a 24 h de extração.

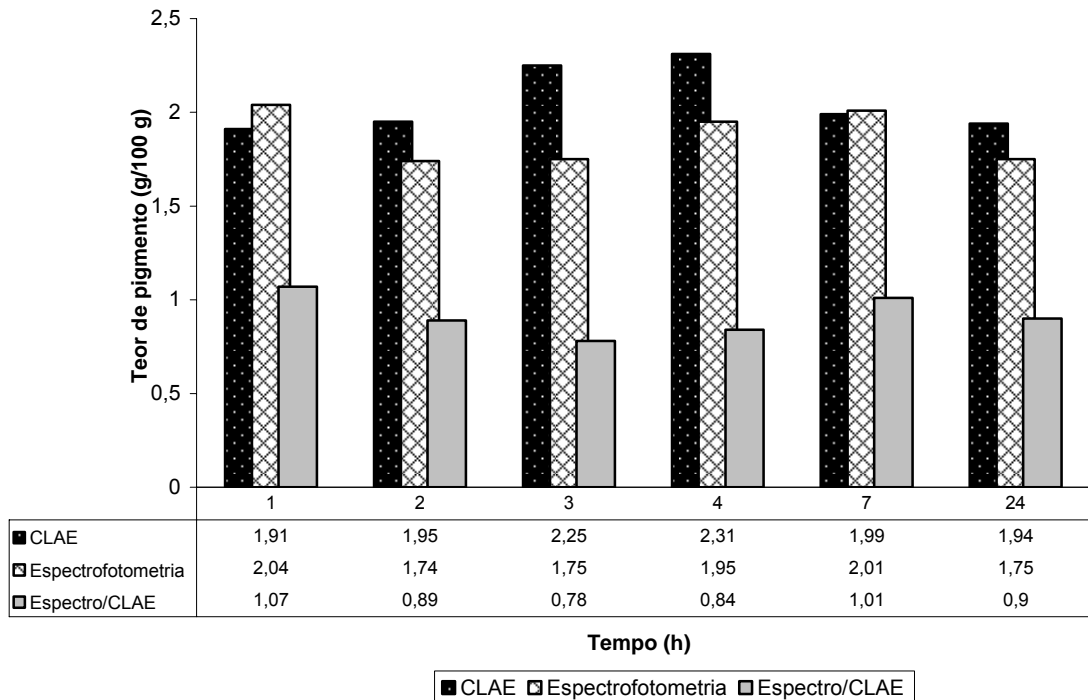


Figura 4: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com KOH 0,1 N à temperatura ambiente, de 1 a 24 h de extração, e razão Espectro/CLAE.

De acordo com as Figuras 3 e 4, não foi observado aumento no teor de bixinóides totais extraídos com o aumento no tempo de extração. Notou-se, mais claramente na quantificação por CLAE, que o teor de bixinóides totais permaneceu praticamente constante durante todo o tempo de extração (1,91% em uma hora de extração e 1,94% em 24 horas de extração – Figura 4).

Estabeleceu-se a razão entre os teores de bixinóides totais obtidos por espectrofotometria e por CLAE (Figura 4) para que se verificasse a validade de ambas as metodologias na quantificação dos pigmentos. Uma relação constante de Espectro/CLAE ao longo de um mesmo ensaio significa uma convergência entre ambos os métodos na determinação dos pigmentos, e que, salvos alguns desvios, indica segurança dos métodos.

Quando se estabelecem comparações entre métodos de quantificação de pigmentos por CLAE e por espectrofotometria, normalmente são encontrados desvios entre os métodos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1988; ALVES et al., 2006). A espectrofotometria, numa dada região do espectro visível (neste trabalho, de 400 nm a 550 nm), irá quantificar todos os compostos que apresentam alguma absorção nesta região, apesar de que, quando se utilizam o comprimento de onda de máxima absorção e o coeficiente de absorvidade relativo a este comprimento de onda, a absorção nos outros comprimentos de onda é minimizada. Apesar disso, por espectrofotometria, são quantificados outros pigmentos que não a bixina e a norbixina. A bixina e a norbixina, por espectrofotometria, são quantificadas juntas, e o resultado pode ser expresso em percentual de pigmentos totais, já que, mesmo utilizando métodos direcionados para uma ou para a outra, seus comprimentos de onda de máxima absorção são próximos. Neste trabalho, o comprimento de onda escolhido para se realizarem os cálculos foram 505 nm, nas amostras onde havia predominância de bixina, e 503 nm, para as amostras onde a norbixina predominava. De acordo com RODRIGUEZ-AMAYA (1988) e LEVY e RIVADENEIRA (2000), nestes comprimentos de onda há menos interferência da possível presença de produtos de decomposição amarelos, que ficariam sobrepostos na curva espectral. Já a técnica de CLAE, como quantifica separadamente os pigmentos de urucum bixina e norbixina, nos fornece mais informações

acerca do que foi extraído e do teor de outros carotenóides possivelmente interferentes no extrato, que poderiam ter sido quantificados pela espectrofotometria.

Dados os desvios entre as técnicas de CLAE e espectrofotometria, é comum se encontrarem resultados mais elevados do teor de pigmentos quando se usa a espectrofotometria, comparado ao teor encontrado quando se usa a CLAE. Entretanto, neste ensaio, na maioria dos tempos de extração avaliados (2, 3, 4 e 24 h), os resultados obtidos pela CLAE foram superiores àqueles obtidos por espectrofotometria (Figura 4). Possivelmente houve degradação dos pigmentos nos frascos destinados à análise por espectrofotometria, já que, neste ensaio, os extratos, antes de serem diluídos no solvente adequado de leitura espectrofotométrica (solução de 3,7% de ácido acético em clorofórmio), foram diluídos em uma solução de tetrahidrofurano:acetonitrila:água (1:1:2) e armazenados. Suspeitou-se que esta solução poderia ter causado a oxidação e a conseqüente degradação dos pigmentos, o que explicaria os baixos valores encontrados para o método espectrofotométrico.

A Figura 5 mostra os cromatogramas obtidos pelas extrações com o NH_4OH 0,5 N, à temperatura ambiente, nos tempos de 30 minutos, 3, 5 e 24 horas.

Observou-se, de acordo com os cromatogramas, que o pigmento majoritário encontrado nos extratos foi a bixina, durante o tempo avaliado. Para o tempo inicial de extração (30 minutos), a bixina correspondeu a aproximadamente 91% da área total dos picos, enquanto a norbixina correspondeu a cerca de 2% apenas. Neste tempo, a soma das áreas da bixina e da norbixina correspondeu a 93% do total. De acordo com o andamento da reação, já a 3 horas de extração, observou-se ligeiro aumento na conversão da bixina a norbixina. Aqui, a bixina correspondeu a aproximadamente 87% da área total dos picos, enquanto a norbixina cresceu para aproximadamente 6%, e a soma de seus percentuais ainda atingia 93% do total. Quando o tempo de extração atingiu 5 horas, notou-se que a reação de saponificação prosseguia, com a norbixina correspondendo a cerca de 9% dos pigmentos totais, enquanto a bixina decrescia a 84%. Neste tempo de extração, a soma das áreas da bixina e da norbixina ainda

equivale a 93%. Ao fim de 24 horas de extração, observou-se que a reação ainda ocorria, e a norbixina correspondia a 21% dos pigmentos totais, enquanto a bixina representava aproximadamente 57% dos pigmentos. Entretanto, neste tempo de extração, a soma dos percentuais de bixina e de norbixina foi de apenas 78% do total e, de acordo com a Figura 5, notou-se o surgimento de novos picos no cromatograma, que antes não estavam presentes ou estavam presentes em quantidades muito pequenas. Estes picos poderiam representar compostos oriundos da degradação dos pigmentos bixina e norbixina em compostos de menor peso molecular, ou mesmo da isomerização destes pigmentos. Estas reações de degradação ou de isomerização poderiam, possivelmente, ser ocasionadas pelo longo tempo de extração, em que os pigmentos de urucum ficariam em contato com uma condição de pH elevado por longo tempo, causando esta modificação do perfil dos extratos.

SCOTTER et al. (1998) observaram que a presença de produtos de degradação poderia ser indicativa do uso elevadas temperaturas de extração, mas ressaltam que a bixina poderia também ser submetida à degradação fotocatalisada, e originar compostos similares àqueles oriundos da degradação térmica. É possível que tal processo possa ocorrer durante a extração com solvente da bixina, antes da hidrólise à norbixina.

Portanto, de acordo com a Figura 5, a reação de saponificação da bixina em sal de norbixina ocorreu parcialmente, até o último tempo avaliado. Notou-se que esta reação, nas condições avaliadas, acontecia lentamente, já que o tempo de extração foi elevado (24 h). Com isso, observou-se certa influência do tempo na saponificação da bixina a norbixina durante a extração utilizando NH_4OH 0,5 N, à temperatura ambiente.

Comparado ao solvente KOH 0,1 N, o solvente NH_4OH 0,5 N, à temperatura ambiente e até 24 horas de extração, possibilitou a saponificação da bixina a norbixina de maneira mais eficiente. Ainda, o extrato obtido pelo solvente NH_4OH 0,5 N foi o que apresentou mais alterações em um longo tempo de extração, comparado ao extrato obtido com o KOH 0,1 N, o que poderia ser uma característica indesejável. Notou-se, aqui, que a possível isomerização dos pigmentos de urucum, no extrato obtido por NH_4OH 0,5 N, seria proporcional ao tempo de extração.

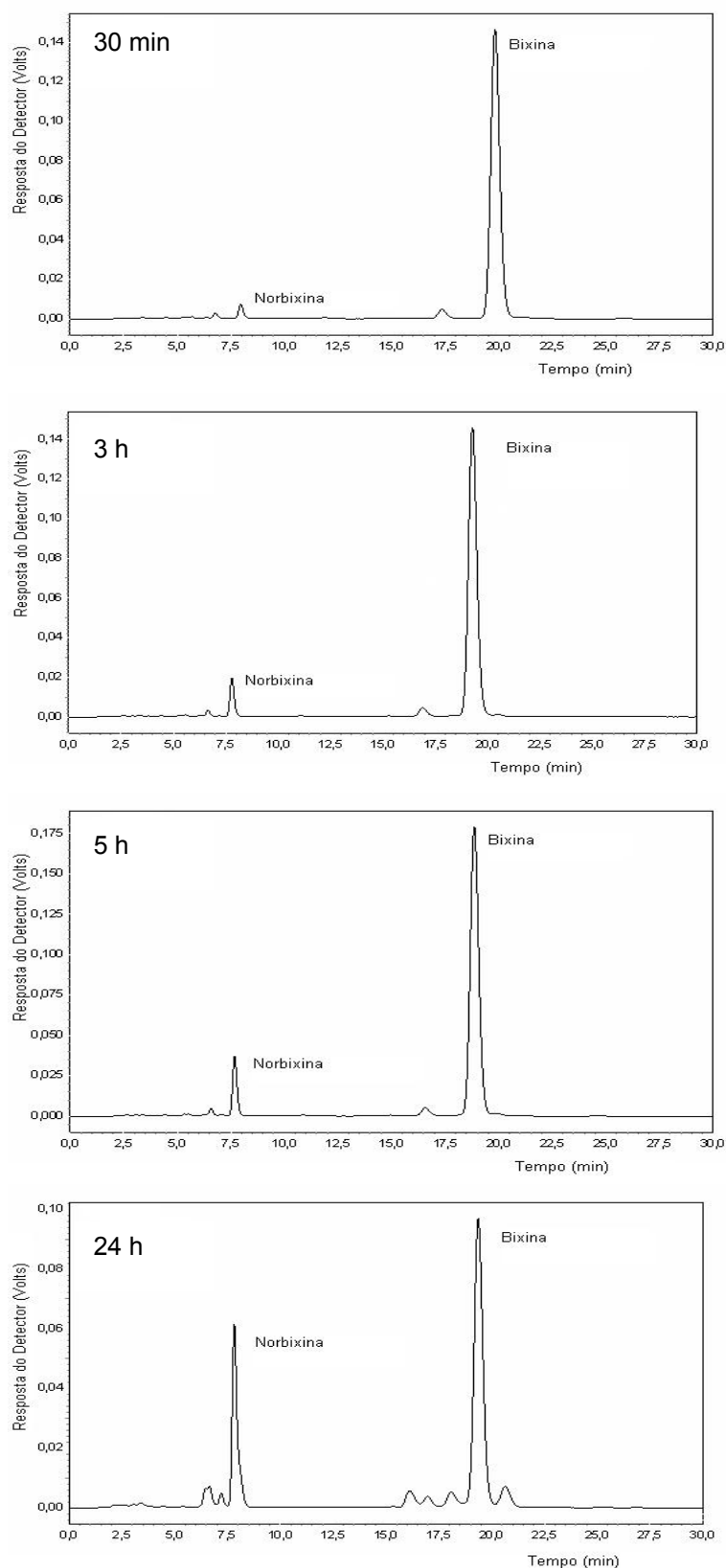


Figura 5: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com NH_4OH 0,5 N, à temperatura ambiente, de 30 minutos a 24 horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

A Figura 6 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, obtidos pela extração com NH_4OH 0,5 N, à temperatura ambiente, nos diferentes tempos avaliados. A Figura 7 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).

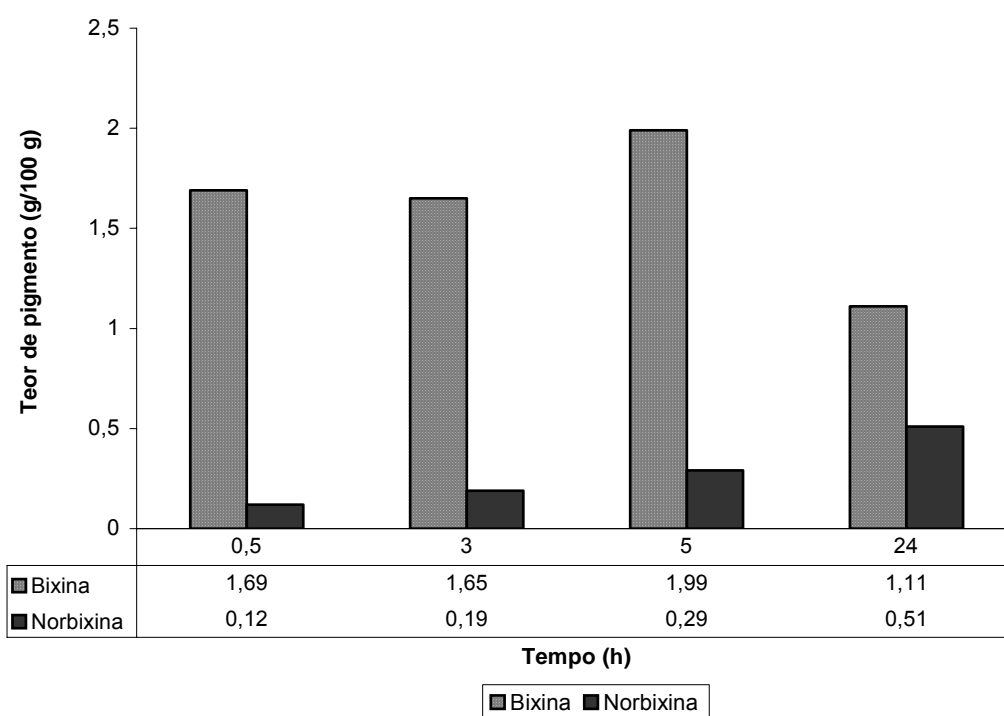


Figura 6: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com NH_4OH 0,5 N à temperatura ambiente, de 30 minutos a 24 h de extração.

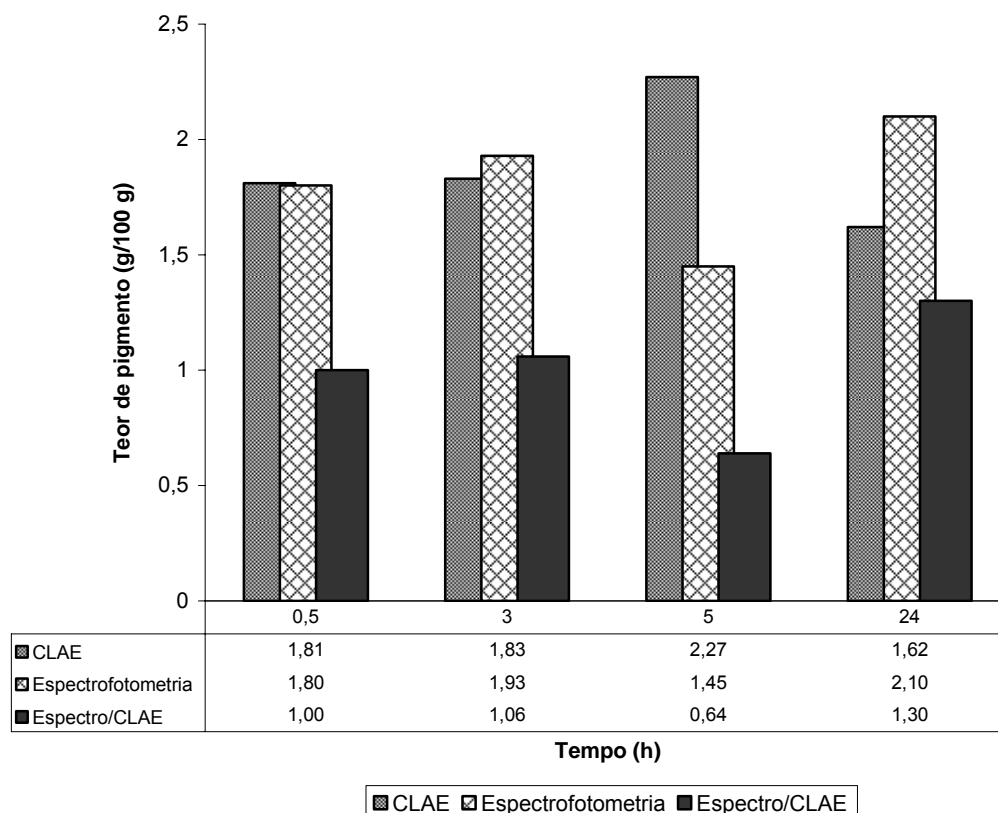


Figura 7: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com NH_4OH 0,5 N à temperatura ambiente, de 30 minutos a 24 h de extração, e razão Espectro/CLAE.

De acordo com as Figuras 6 e 7, pela quantificação por CLAE, ao tempo de 24 horas de extração, os teores de bixinóides totais diminuíram sensivelmente, quando comparados aos outros tempos de extração. Este fato encontra-se em concordância com a diminuição da soma das áreas dos picos da bixina e da norbixina, que neste tempo caiu para de 93% para 78%. Entretanto, por espectrofotometria, no tempo de 24 horas, não foi observada a diminuição do teor de bixinóides totais, o que pode ser explicado pela formação dos compostos resultantes da isomerização ou de uma possível degradação (Figura 7). Estes novos compostos também foram quantificados pela espectrofotometria. Com isso, em face deste desvio na quantificação entre os dois métodos, neste trabalho recomenda-se a utilização do método de CLAE para a quantificação de pigmentos de urucum, já que com a CLAE são quantificados apenas os compostos de interesse, a bixina e a norbixina, e não outros pigmentos, como observado no método espectrofotométrico.

Aqui, assim como quando se utilizou o solvente KOH 0,1 N, possivelmente houve degradação dos pigmentos nos frascos destinados à análise por espectrofotometria, já que, neste ensaio, os extratos, antes de serem diluídos no solvente adequado de leitura espectrofotométrica (solução de 3,7% de ácido acético em clorofórmio), também foram diluídos em uma solução de tetrahidrofurano:acetonitrila:água (1:1:2) e armazenados. Suspeitou-se que esta solução poderia ter causado a oxidação e a conseqüente degradação dos pigmentos, o que explicaria os baixos valores encontrados para o método espectrofotométrico.

SCOTTER et al. (1998), ao avaliar comparativamente teores de bixina e norbixina de corantes de urucum em pó por espectrofotometria e por CLAE, encontraram concordância entre os métodos em relação ao percentual de pigmentos encontrados. Segundo os autores, esta concordância entre os métodos indicaria que a contribuição de compostos de degradação térmica da bixina (C₁₇) e de outros carotenóides no teor de pigmentos totais presentes seria negligenciável.

3.2. Influência do Tempo de Extração e da Concentração dos Solventes na Reação de Saponificação

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os cromatogramas obtidos pelas extrações com o KOH a 50 °C, nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5%, durante uma e duas horas de extração.

Observou-se, de acordo com os cromatogramas da Figura 8, que o pigmento majoritário oriundo da extração com o KOH a 1%, pelos tempos de uma e duas horas de extração, foi a bixina. Ao tempo de uma hora de extração a bixina correspondeu a 79% da área total dos picos presentes, enquanto a norbixina correspondeu a aproximadamente 12%. A duas horas de extração, a condição não se alterou, sendo que a bixina correspondia a 82% da área total dos picos e a norbixina a 10%. Portanto, nesta condição extratora (KOH 1% a 50 °C), houve uma saponificação parcial da bixina para formar a norbixina, que não se alterou com o tempo.

Quando se elevou a concentração do KOH para 2% (Figura 8), a uma hora de extração notou-se que, apesar do pigmento majoritário ainda

ser a bixina, notou-se maior teor de norbixina formada. Aqui a bixina correspondeu a 62% dos pigmentos formados, enquanto a norbixina a cerca de 30%. A duas horas de extração, houve alteração do extrato, direcionada à maior formação de norbixina. Aqui a norbixina correspondeu a 37% dos pigmentos totais, enquanto a bixina correspondeu a 55%. Portanto, nesta condição extratora (KOH 2% a 50 °C), houve saponificação da bixina a norbixina de forma mais acelerada, quando se comparou à extração com KOH a 1%. Entretanto, quando se compararam os dois tempos de extração, notou-se pouca evolução na reação de saponificação.

Em relação à extração com o KOH 3% (Figura 9), ao tempo de uma hora, observou-se que a norbixina foi o pigmento majoritário encontrado no extrato, correspondendo a 51% dos pigmentos totais. Já a bixina correspondeu a 42%. A duas horas de extração, houve grande alteração no perfil do extrato, com a norbixina representando aproximadamente 85% dos pigmentos totais e a bixina representando apenas 6% dos pigmentos. Portanto, nesta condição extratora (KOH 3% a 50 °C), houve saponificação da bixina a norbixina quase totalmente, e notou-se grande dependência do tempo de extração na formação da norbixina.

Na extração com o KOH 4% (Figura 9), ao tempo de uma hora, observou-se que o principal pigmento extraído foi a norbixina, representando 74% da área total dos picos, enquanto a bixina respondia por apenas 18%. A duas horas de extração, notou-se que a reação de saponificação continuava ocorrendo, com a norbixina representando 84% dos pigmentos totais e a bixina cerca de 9%. Com isso, nesta condição extratora (KOH 4% a 50 °C), houve saponificação da bixina a norbixina, moderadamente intensificada pelo tempo.

Utilizando-se o KOH 5% (Figura 10), durante uma hora de extração, a norbixina extraída correspondeu a 69% dos pigmentos totais, enquanto a bixina correspondeu a 23%. Já a duas horas de extração, a norbixina correspondeu a 88% dos pigmentos totais, enquanto a bixina respondeu apenas por 4% dos pigmentos. Notou-se que a reação de saponificação estava ocorrendo de forma eficiente e, assim como para o KOH 4%, foi moderadamente intensificada pelo tempo.

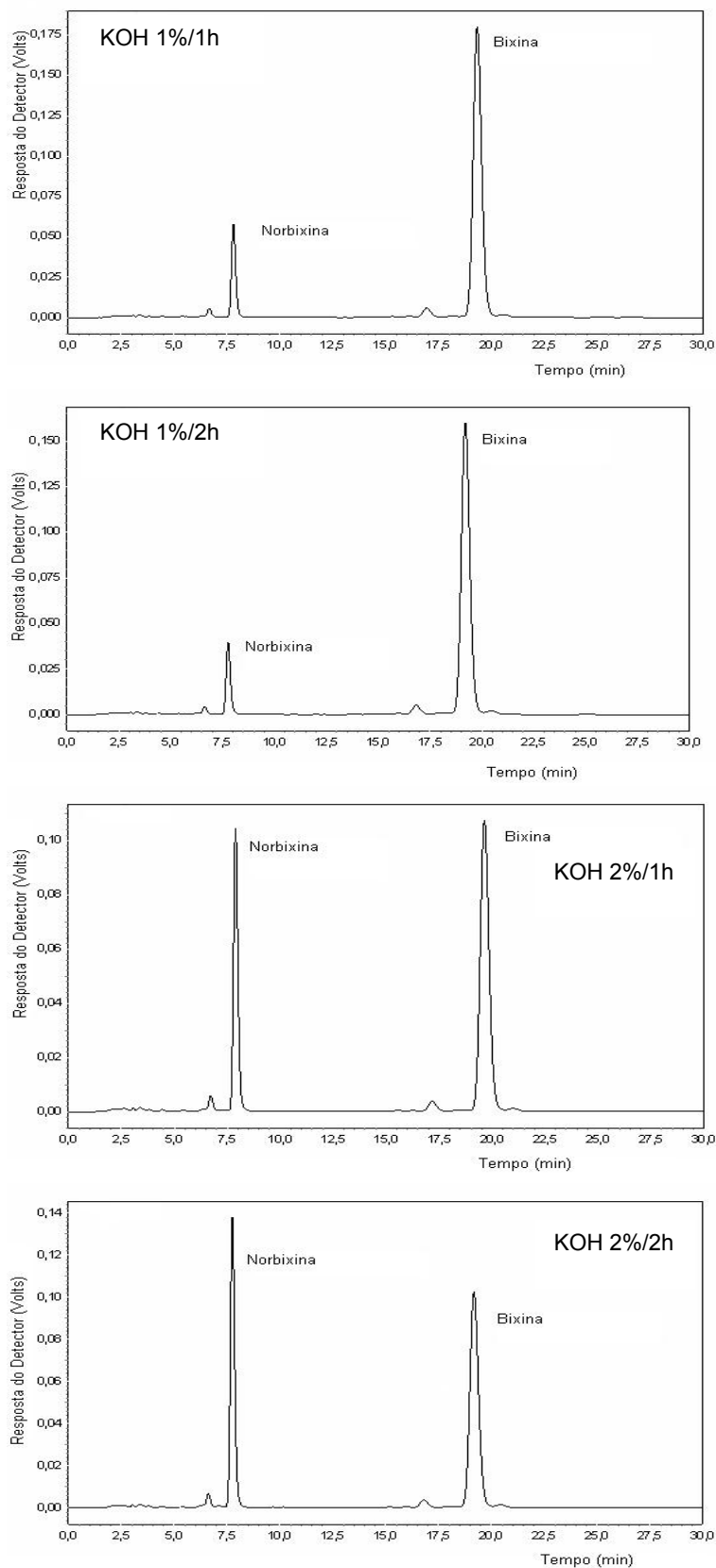


Figura 8: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH a 1% e 2%, a 50 °C, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

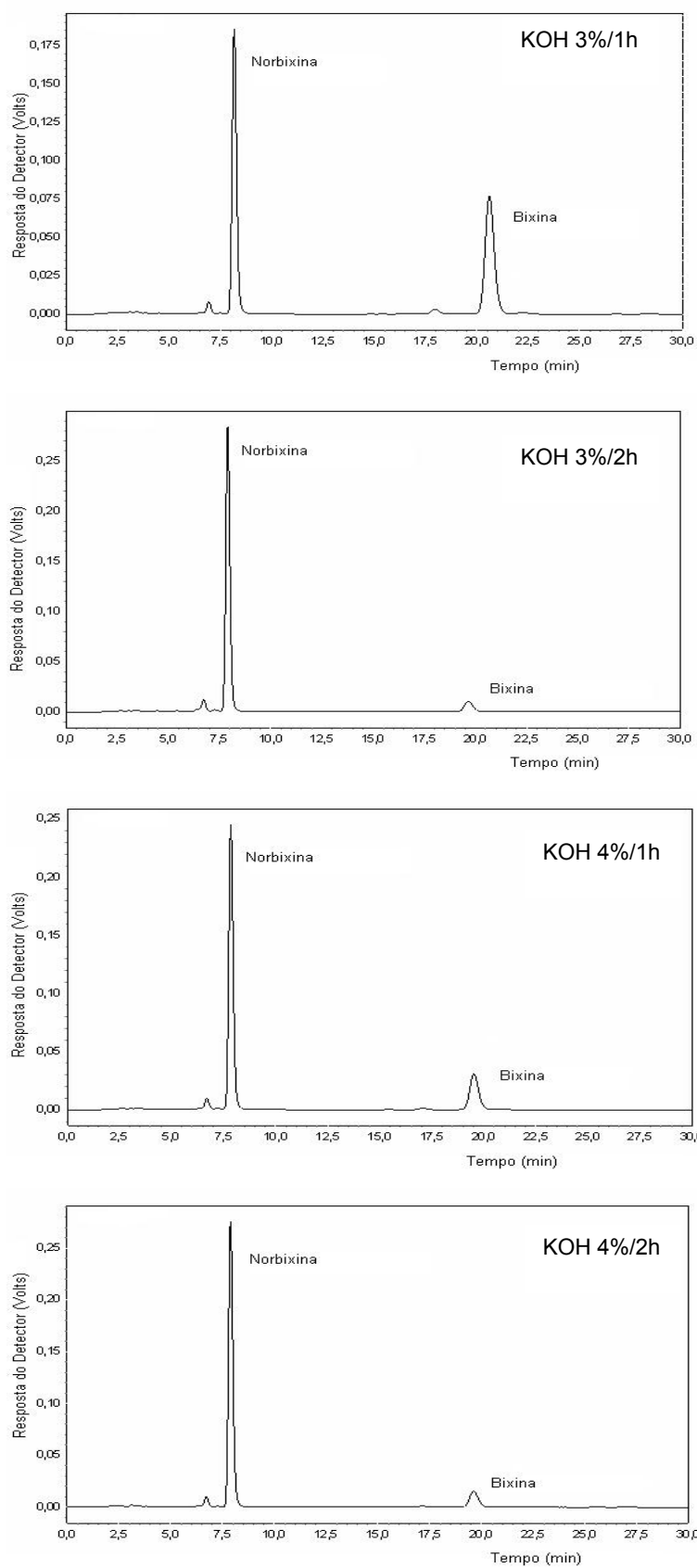


Figura 9: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH a 3% e 4%, a 50 °C, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

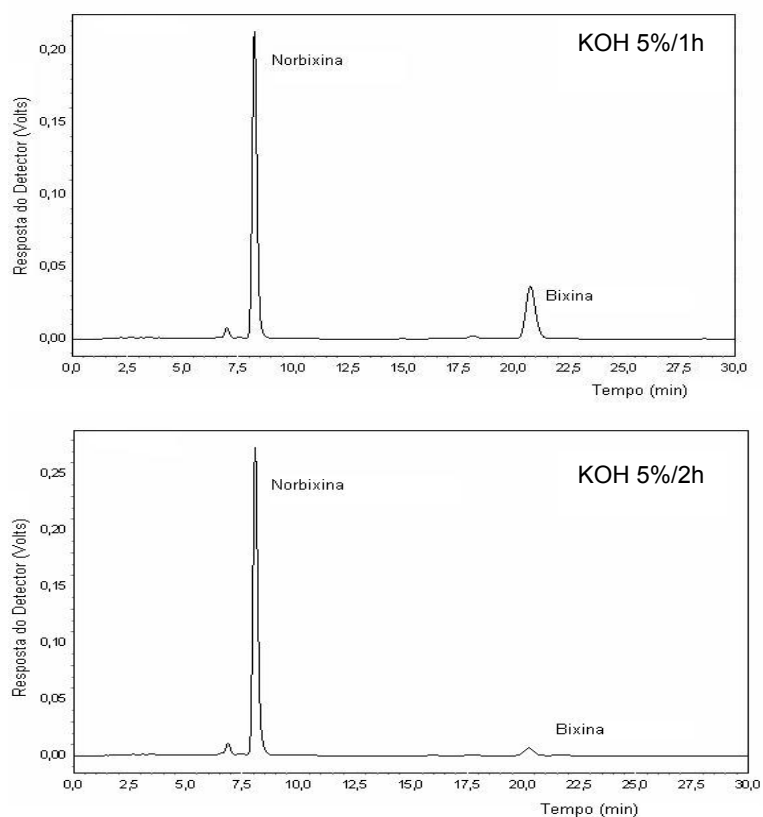


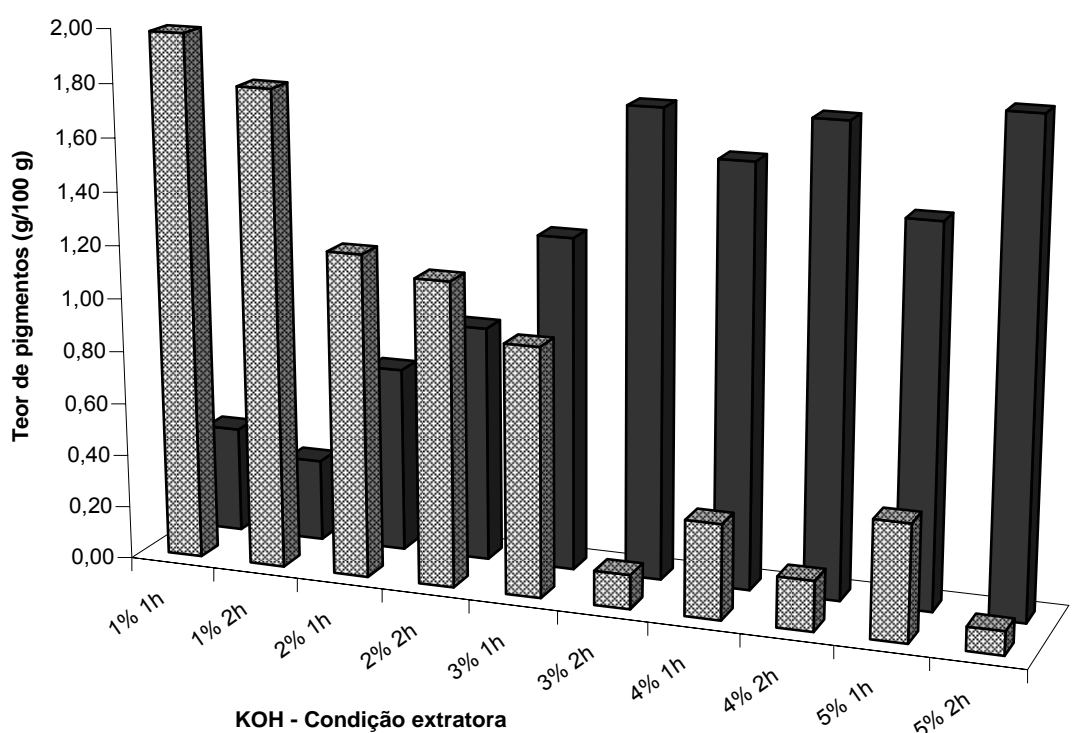
Figura 10: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH a 5%, a 50 °C, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

Analisando-se as Figuras 8, 9 e 10, observou-se que a reação de saponificação da bixina a norbixina tem sua velocidade aumentada com o aumento da concentração de KOH, na faixa de concentrações avaliadas. Observou-se, também, a influência do tempo na conversão da bixina a norbixina, de forma mais evidente para as concentrações de KOH de 3% a 5%.

PRENTICE-HERNANDEZ et al. (1992), ao avaliar o percentual de bixina e norbixina produzidas na extração com NaOH variando de 0,2 a 0,6%, durante duas horas, encontraram que para as soluções de NaOH 0,2 e 0,3% não houve formação de norbixina, mas somente de bixina. A partir das soluções de NaOH de 0,4 a 0,6%, os autores observaram a saponificação do grupo éster, formando a norbixina dentro de uma reação considerada irreversível. Estes resultados concordam com os resultados obtidos até aqui, de que a reação de hidrólise do grupamento éster da bixina é dependente da concentração da base. Entretanto, quando se utilizou KOH

0,1 N (que corresponde a 0,6%), no item 3.1. deste trabalho, não foi observada formação de norbixina, mesmo em 24 horas de extração. PRENTICE-HERNANDEZ et al. (1992), ao se utilizar a base NaOH 0,6%, já observaram a formação de norbixina. Com isso, observa-se que o tipo de base deveria influenciar na reação de saponificação.

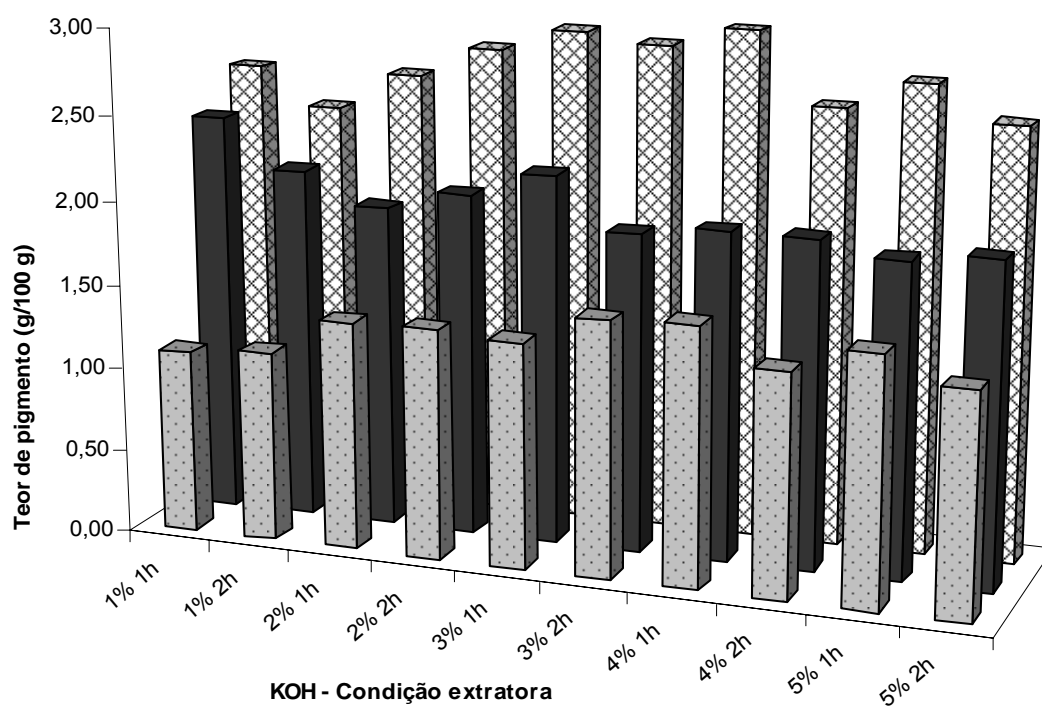
A Figura 11 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, obtidos pela extração com KOH a diferentes concentrações, a 50 °C, variando-se o tempo de extração. A Figura 12 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).



	1% 1h	1% 2h	2% 1h	2% 2h	3% 1h	3% 2h	4% 1h	4% 2h	5% 1h	5% 2h
▣ Bixina	1,98	1,80	1,22	1,15	0,94	0,13	0,36	0,19	0,44	0,09
■ Norbixina	0,40	0,31	0,70	0,89	1,26	1,76	1,59	1,76	1,43	1,83

▣ Bixina ■ Norbixina

Figura 11: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com KOH a 50 °C, nas concentrações de 1 a 5%, durante 1 e 2 h de extração.



	1% 1h	1% 2h	2% 1h	2% 2h	3% 1h	3% 2h	4% 1h	4% 2h	5% 1h	5% 2h
Espectro/CLAE	1,09	1,13	1,36	1,37	1,34	1,52	1,54	1,33	1,48	1,33
CLAE	2,38	2,10	1,92	2,04	2,19	1,89	1,95	1,95	1,87	1,92
Espectrofotometria	2,60	2,38	2,61	2,80	2,93	2,88	3,00	2,59	2,76	2,56

Espectro/CLAE CLAE Espectrofotometria

Figura 12: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com KOH a 50 °C, nas concentrações de 1 a 5%, durante 1 e 2 h de extração, e razão Espectro/CLAE.

De acordo com as Figuras 11 e 12, não houve aumento nos teores de pigmentos extraídos quando se aumentou o tempo de extração de uma para duas horas. Ainda, pelas duas técnicas analisadas (CLAE e espectrofotometria) observou-se que o aumento na concentração do álcali não proporcionou um aumento no teor de pigmentos extraídos.

Os teores de bixinóides totais obtidos por espectrofotometria foram superiores àqueles obtidos por CLAE (Figura 12). Isso foi esperado de ocorrer, pois, conforme já discutido no item 3.1., a espectrofotometria quantifica pigmentos totais que absorvem na região analisada.

A relação espectro/CLAE foi calculada para se verificar a convergência entre os métodos CLAE e espectrofotometria na quantificação

dos bixinóides totais. Notou-se, para cada condição extratora nos dois tempos avaliados (por exemplo, KOH 1%, 1 e 2h – Figura 12), que as relações foram bem próximas, indicando a validade de ambos os métodos, apesar das diferenças encontradas quando se analisam ambos de forma comparativa.

As Figuras 13, 14 e 15 mostram os cromatogramas obtidos pelas extrações com o NH_4OH à temperatura ambiente, nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5%, durante uma e duas horas de extração.

De acordo com as Figuras 13, 14 e 15, ao se utilizar o solvente alcalino NH_4OH a diferentes concentrações, à temperatura ambiente e em tempos variando de uma a duas horas de extração, não ocorreu a reação de saponificação da bixina para a formação do sal da norbixina de forma apreciável. Notou-se que, tanto em uma hora de extração quanto em duas horas, para quaisquer das concentrações avaliadas, o pigmento majoritário extraído foi a bixina, correspondendo entre 87 e 90% dos pigmentos totais. A norbixina correspondeu de 2 a 5% dos pigmentos totais apenas. Com isso, verificou-se que a reação de saponificação não foi dependente da concentração quando se utilizou o solvente NH_4OH nas concentrações avaliadas. Ainda, o tempo de duas horas não foi suficiente para a formação da norbixina.

PRENTICE-HERNANDEZ et al. (1992) observaram que, quando se utilizavam soluções de concentrações crescentes (e crescentes pH), além da crescente diminuição da concentração de bixina e aumento na concentração de norbixina, houve progressivo aumento na concentração de *trans*-bixina. Essa isomerização não foi observada neste trabalho quando se aumentou a concentração das bases KOH e NH_4OH .

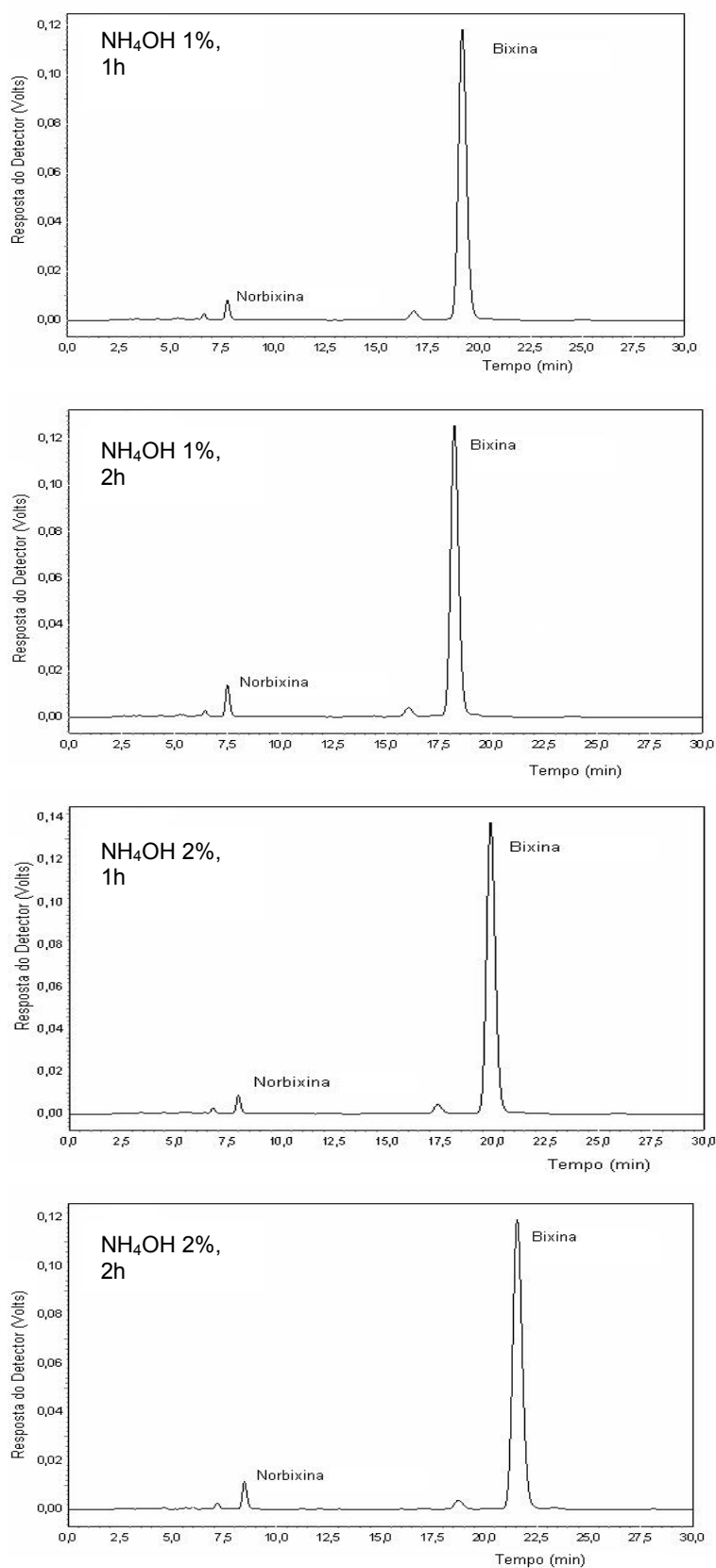


Figura 13: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com NH₄OH a 1% e 2%, à temperatura ambiente, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

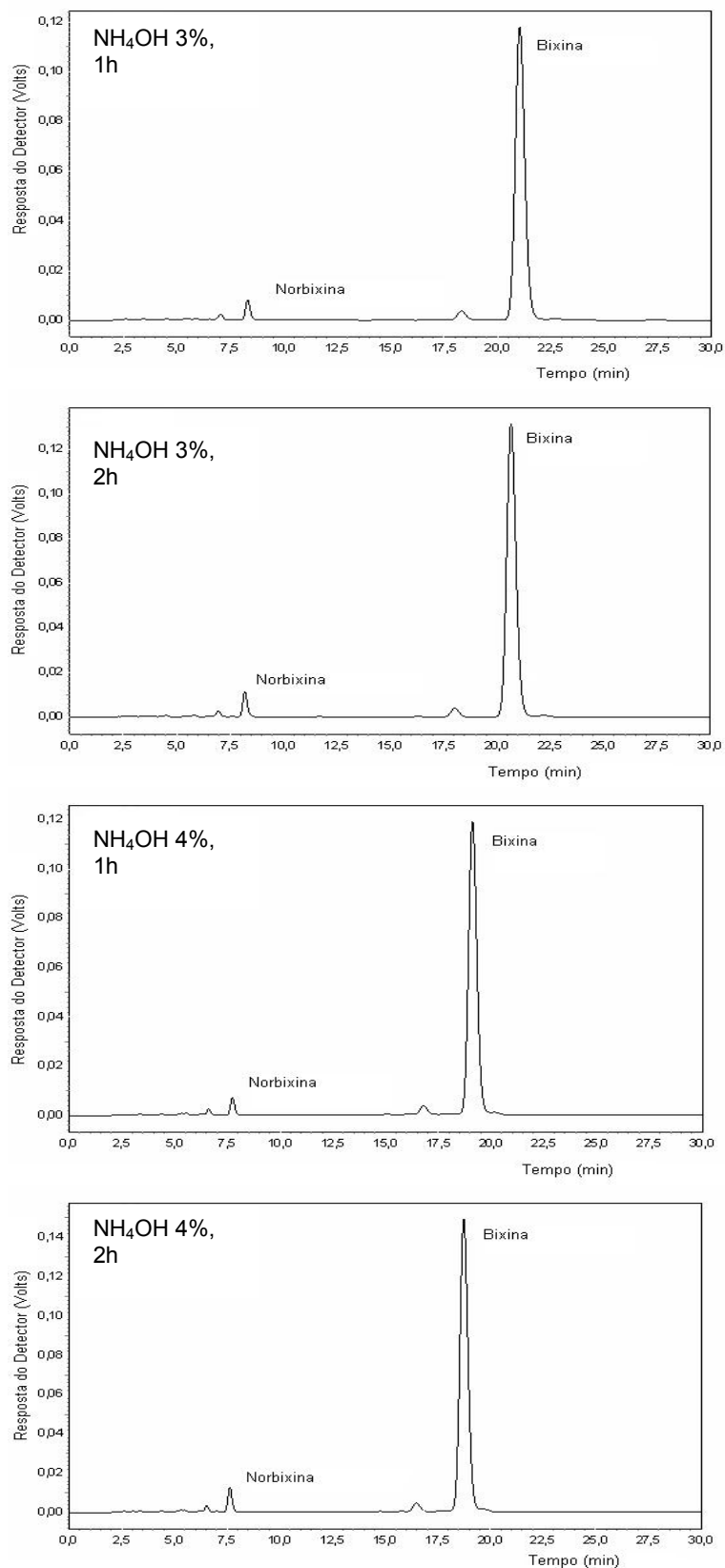


Figura 14: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com NH₄OH a 3% e 4%, à temperatura ambiente, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetoneitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

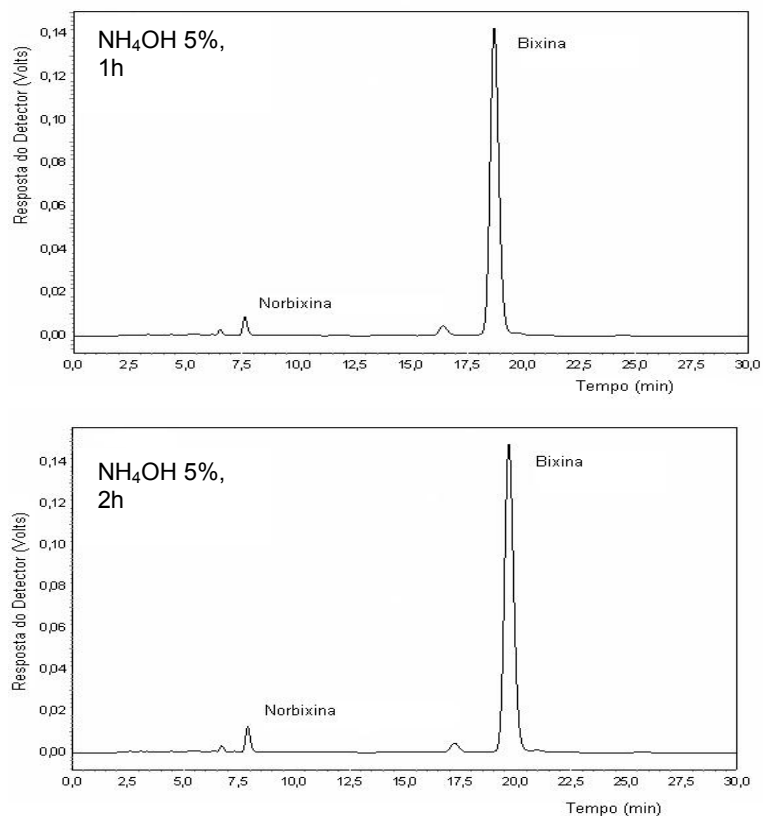
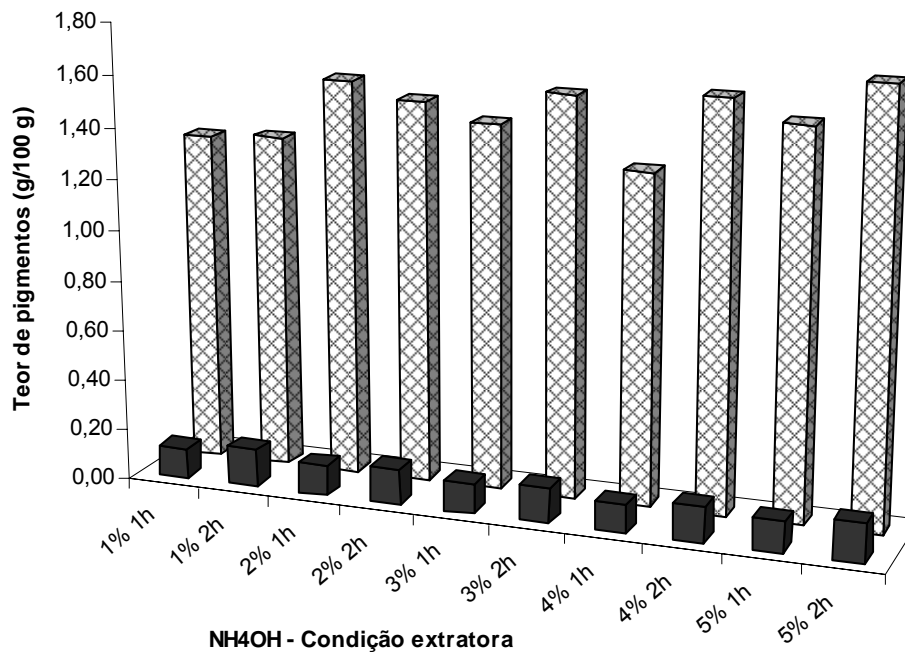


Figura 15: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com NH₄OH a 5%, à temperatura ambiente, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

A Figura 16 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, obtidos pela extração com NH₄OH a diferentes concentrações, à temperatura ambiente, variando-se o tempo de extração. A Figura 17 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).



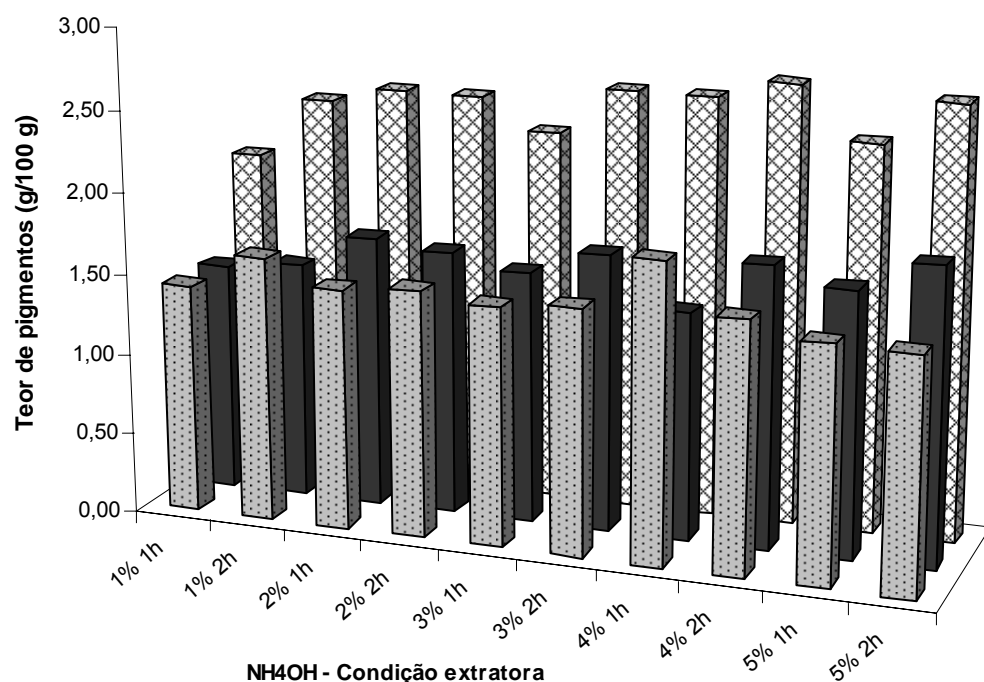
	1% 1h	1% 2h	2% 1h	2% 2h	3% 1h	3% 2h	4% 1h	4% 2h	5% 1h	5% 2h
■ Norbixina	0,12	0,15	0,12	0,14	0,12	0,14	0,11	0,14	0,12	0,15
▨ Bixina	1,30	1,32	1,56	1,50	1,44	1,57	1,30	1,60	1,52	1,69

■ Norbixina ▨ Bixina

Figura 16: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com NH₄OH à temperatura ambiente, nas concentrações de 1 a 5%, durante 1 e 2 h de extração.

De acordo com as Figuras 16 e 17, de forma geral, não houve aumento nos teores de pigmentos extraídos quando se aumentou o tempo de extração de uma para duas horas. Ainda, pelas duas técnicas analisadas (CLAE e espectrofotometria) observou-se que o aumento na concentração do álcali não proporcionou um aumento no teor de pigmentos extraídos, de forma similar ao encontrado para o solvente KOH.

Observou, também, que os teores de bixinóides totais (Figura 17) obtidos por espectrofotometria foram superiores àqueles obtidos por CLAE, de forma similar ao encontrado para o solvente KOH.



	1% 1h	1% 2h	2% 1h	2% 2h	3% 1h	3% 2h	4% 1h	4% 2h	5% 1h	5% 2h
Espectro/CLAE	142	164	149	153	148	152	185	155	146	145
CLAE	142	147	168	164	156	171	141	174	164	183
Espectrofotometria	2,02	2,40	2,50	2,50	2,31	2,60	2,60	2,71	2,39	2,66

Espectro/CLAE ■ CLAE ▨ Espectrofotometria

Figura 17: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com NH_4OH à temperatura ambiente, nas concentrações de 1 a 5%, durante 1 e 2 h de extração, e razão Espectro/CLAE.

3.3. Influência do Tempo de Extração à Temperatura de 70 °C na Eficiência da Reação de Saponificação

A Figura 18 apresenta os cromatogramas obtidos pelas extrações com os solventes KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N, a 70 °C, durante uma e duas horas de extração.

De acordo com os cromatogramas da Figura 18, na extração com o KOH 0,1 N a 70 °C por uma hora, observou-se que o pigmento majoritário extraído foi a bixina, correspondendo a 57% da área total dos picos. A norbixina correspondeu a 24% da área total dos picos. Observou-se a ocorrência da reação de conversão da bixina em sal de norbixina de forma

parcial. Houve a formação de novos picos nos cromatogramas, indicando a formação de compostos oriundos da degradação ou possivelmente da isomerização dos pigmentos devido à ação da temperatura. A soma das áreas dos picos da bixina e da norbixina foi de 81%, e os novos picos formados corresponderam a um total de 17% dos pigmentos totais. Ao tempo de duas horas de extração, a bixina correspondeu a 56% da área total dos picos e a norbixina a 22%. Notou-se que a reação de saponificação não evoluiu com o avanço do tempo. Entretanto, as possíveis reações de isomerização continuaram ocorrendo, já que a soma das áreas de bixina e norbixina decresceu a 78%, enquanto os compostos isômeros ou oriundos da degradação dos pigmentos principais corresponderam a aproximadamente 19% dos pigmentos totais.

Na reação com o NH_4OH 0,5 N a 70 °C durante uma hora, observou-se que o pigmento majoritário extraído foi a bixina, correspondendo a cerca de 80% dos pigmentos totais, enquanto a norbixina respondeu por 4% apenas. Também aqui notou-se a formação de novos picos no cromatograma, possivelmente de compostos oriundos da isomerização ou degradação dos pigmentos principais, mas em menor proporção se comparado aos extratos de KOH 0,1 N nas mesmas condições. Os novos compostos corresponderam a 13% dos pigmentos totais. A duas horas de extração, não foi observado aumento na velocidade da reação de saponificação, com a bixina correspondendo a 84% dos pigmentos totais, enquanto a norbixina correspondeu a 2% apenas. Os compostos de isomerização e/ou degradação formados responderam por 11% dos pigmentos totais.

Segundo HENRY (1996) e SCOTTER et al. (1998), na extração direta com solvente alcalino empregando temperaturas acima de 70 °C, há tendência à formação dos isômeros *trans* da norbixina via reação de isomerização termicamente direcionada. Ainda, a isomerização e a degradação do pigmento podem ocorrer simultaneamente.

Deve-se ressaltar, aqui, que o uso da extração a quente quando se utilizou o solvente NH_4OH 0,5 N não foi favorecido, pois trata-se de um solvente volátil. Houve dificuldade em se manter o sistema hermeticamente fechado pela pressão interna que a ação do calor gerava sob o solvente.

Com isso, nos tempos de extração avaliados, pode ter havido perdas de amônia para o ambiente, modificando a concentração do solvente durante a extração, e, conseqüentemente, tornando a extração menos eficiente. Com base nestas observações, recomenda-se o uso de NH_4OH à temperatura ambiente.

Foi observado neste trabalho, de maneira similar a WOOD et al. (1991) e SCOTTER et al. (1998), que os diferentes procedimentos de extração podem levar à formação de diferentes perfis de isômeros devido a sua solubilidade e/ou estabilidade diferenciais no meio, que poderiam ser complicadas pelos efeitos da luz e do oxigênio durante a extração e a manipulação, e pela fonte de pigmentos. Ainda, poderiam ser formados produtos de rearranjo ou de degradação, que ainda têm valor como corante.

A Figura 19 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, obtidos pela extração com KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N, a 70 °C, variando-se o tempo de extração. A Figura 20 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).

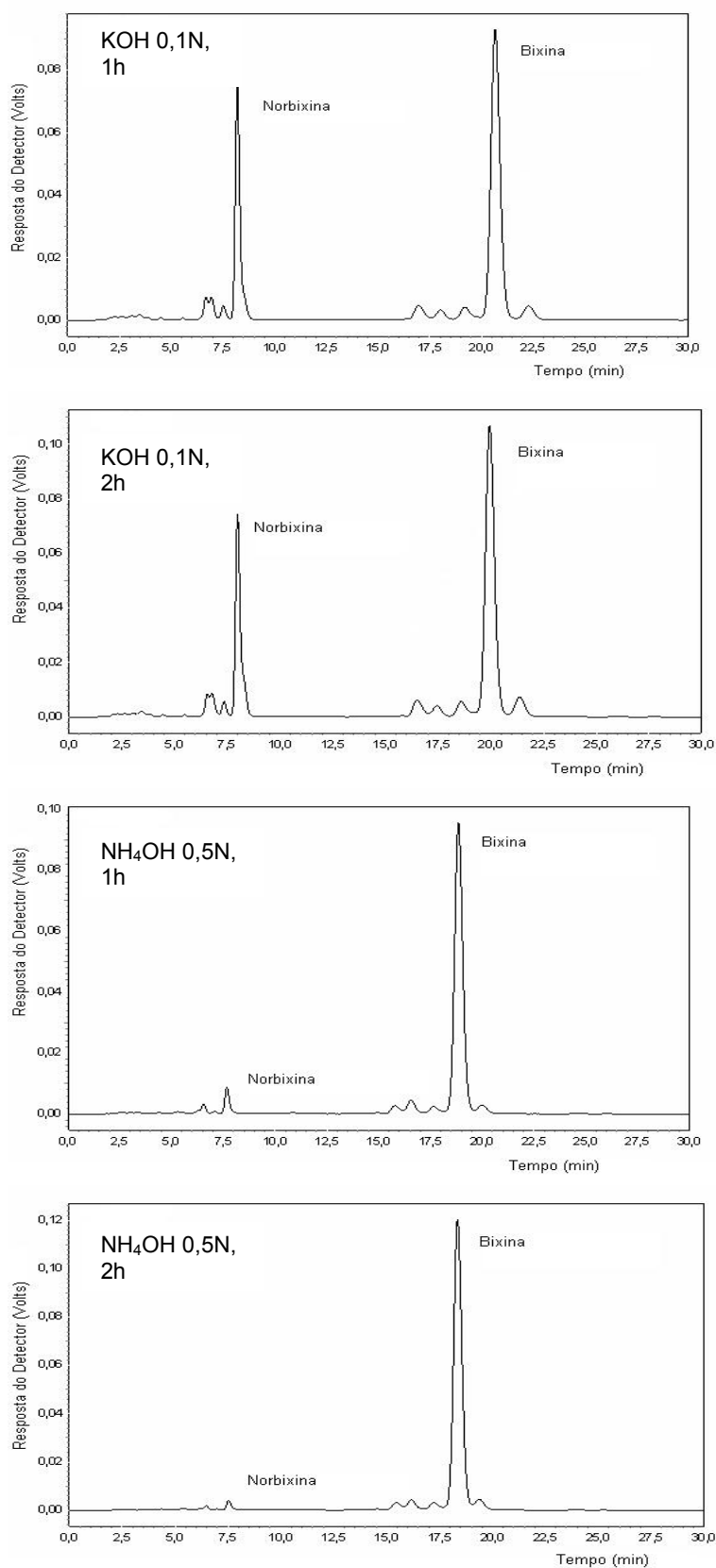
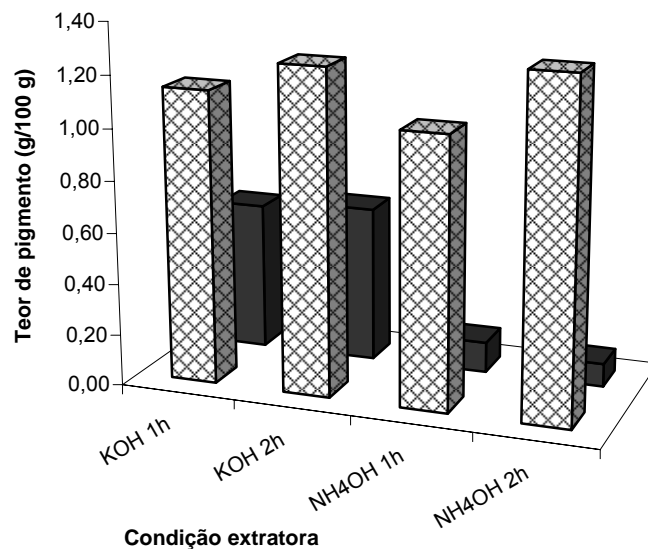


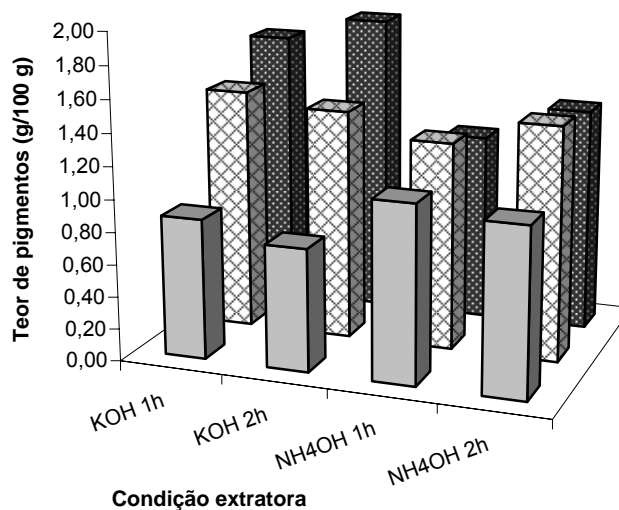
Figura 18: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH 0,1 N e com NH₄OH 0,5 N, a 70 °C, durante uma e duas horas de extração. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.



	KOH 1h	KOH 2h	NH4OH 1h	NH4OH 2h
■ Bixina	1,14	1,26	1,05	1,30
■ Norbixina	0,58	0,61	0,12	0,09

■ Bixina ■ Norbixina

Figura 19: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, a 70 °C, durante 1 e 2 h de extração.



	KOH 1h	KOH 2h	NH4OH 1h	NH4OH 2h
■ Espectro/CLAE	0,87	0,76	1,10	1,04
■ Espectrofotometria	1,50	1,43	1,29	1,45
■ CLAE	1,72	1,87	1,17	1,39

■ Espectro/CLAE ■ Espectrofotometria ■ CLAE

Figura 20: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N, a 70 °C, durante 1 e 2 h de extração, e razão Espectro/CLAE.

De acordo com as Figuras 19 e 20, a relação Espectro/CLAE foi basicamente constante para cada condição extratora avaliada (KOH e NH₄OH). Ambos os métodos cromatográficos e espectrofotométricos foram válidos para a quantificação dos pigmentos. Aqui, os teores de pigmentos obtidos pelo método espectrofotométrico foram quase sempre menores que aqueles encontrados para o método de CLAE. Isso pode ser explicado pela diluição prévia das amostras destinadas à análise espectrofotométrica na mistura tetrahidrofurano:acetonitrila:água (1:1:2) e armazenamento antes da leitura, o que poderia causar a degradação dos pigmentos, conforme explicado no item 3.1.

3.4. Influência de Diferentes Temperaturas de Extração na Reação de Saponificação

A Figura 21 mostra os cromatogramas dos extratos produzidos pelo solvente KOH a 4%, durante uma hora de extração, variando-se a temperatura do processo.

De acordo com os cromatogramas da Figura 21, à temperatura ambiente, o KOH 4% promoveu a saponificação parcial da bixina a norbixina em uma hora de extração. A bixina correspondeu a 57% da área total dos picos e a norbixina a 37%. Quando se elevou a temperatura a 50 °C, o sistema extrator proporcionou a conversão da bixina a norbixina de forma mais rápida. Aqui a bixina correspondeu a apenas 18% dos pigmentos totais, enquanto a norbixina respondeu por 74% dos pigmentos. Ao se elevar a temperatura de extração a 60 °C, durante uma hora, a reação de saponificação ocorreu de forma mais intensa, se comparada ao extrato a 50 °C. A bixina respondeu por cerca de 5% dos pigmentos totais apenas, enquanto a norbixina representou 88%. À temperatura de extração de 70 °C, ao final de uma hora de extração, foi observada a conversão total da bixina a norbixina, e a norbixina correspondeu a 92% dos pigmentos totais dos extratos, enquanto a bixina praticamente não foi detectada.

Verificou-se, de acordo com a Figura 21, que com o KOH 4% a 70 °C não houve a formação de compostos possivelmente isômeros ou oriundos da degradação da bixina e da norbixina, como foi observado na

Figura 18. Com isso, para o solvente KOH, suspeitou-se de que a isomerização e/ou a degradação da bixina e da norbixina poderia estar ligada à baixa concentração do álcali e à ação do calor, já que quando foi realizada a extração com KOH 0,1 N (ou 0,6%) a 70 °C por uma hora (Figura 18), estes compostos foram formados, e quando se elevou a concentração do solvente (Figura 21), os compostos não foram formados ou foram totalmente degradados a ponto de não serem detectados.

PRENTICE-HERNANDEZ et al. (1993) observaram que em pH de extração acima de 11 houve predominantemente a isomerização *cis-trans* da bixina, e não a hidrólise da bixina produzindo a norbixina. Os autores observaram que a hidrólise da bixina a norbixina só foi efetiva quando se aplicou calor ao sistema. Estes resultados diferiram dos encontrados neste trabalho, pois ao se utilizar KOH 4%, que apresenta um pH acima de 13, não foi observada a isomerização, e sim a hidrólise da bixina formando norbixina, mesmo a temperatura ambiente e a temperaturas mais baixas como 50 °C. Ao contrário, quando se utilizou solução mais diluída (KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N) e calor (70 °C), como no item 3.3. deste trabalho, foi observada menor hidrólise da bixina e maior isomerização *cis-trans*.

A Figura 22 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina, obtidos pela extração com o KOH a 4%, durante uma hora de extração, às temperaturas ambiente, 50, 60 e 70 °C. A Figura 23 apresenta os resultados da quantificação dos pigmentos de urucum, bixina e norbixina juntamente (bixinóides totais), por CLAE e por espectrofotometria, de forma comparativa, e apresenta a razão entre os valores obtidos em cada técnica analítica (Espectrofotometria/CLAE).

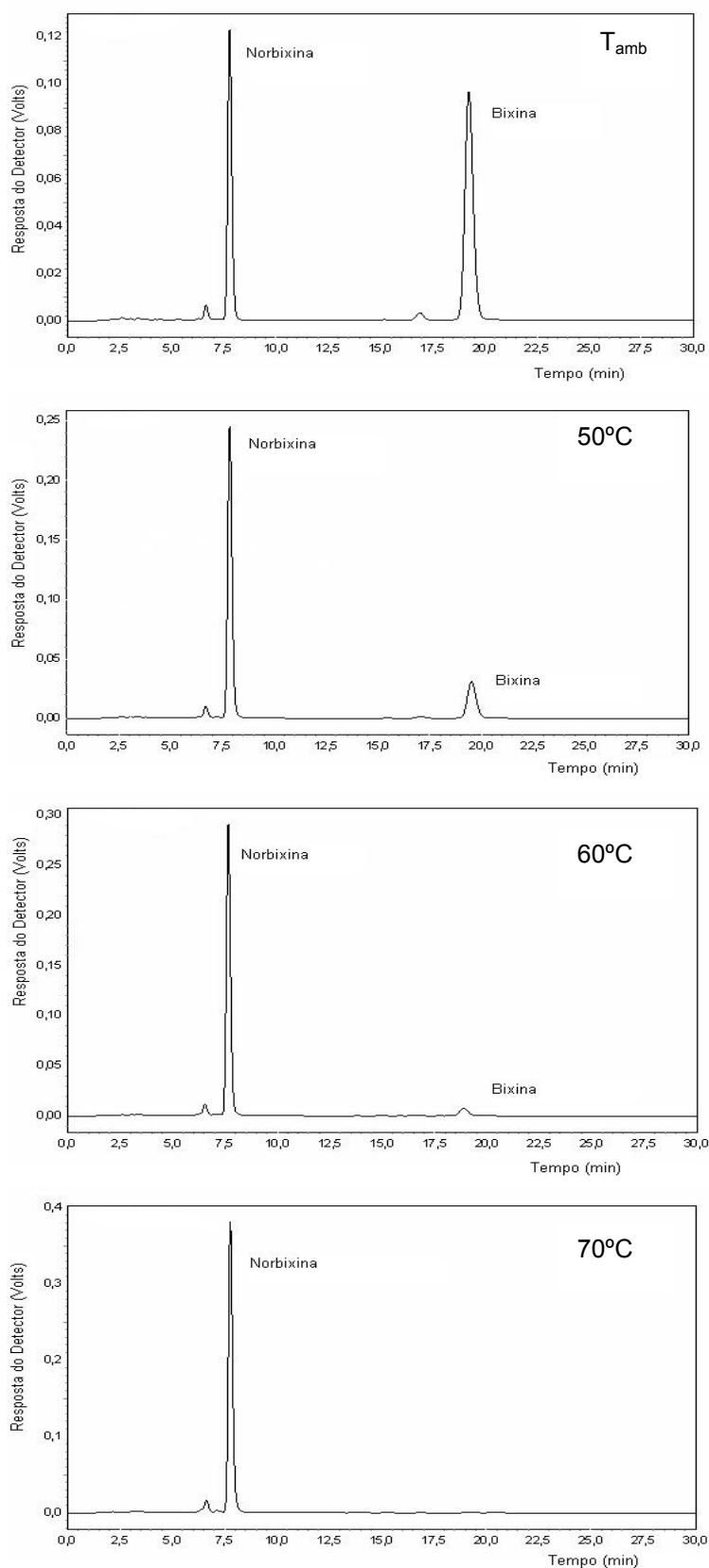


Figura 21: Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos produzidos com KOH 4%, durante uma hora de extração, à temperatura ambiente, 50 °C, 60 °C e 70 °C. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 mL/min. Detecção a 460 nm.

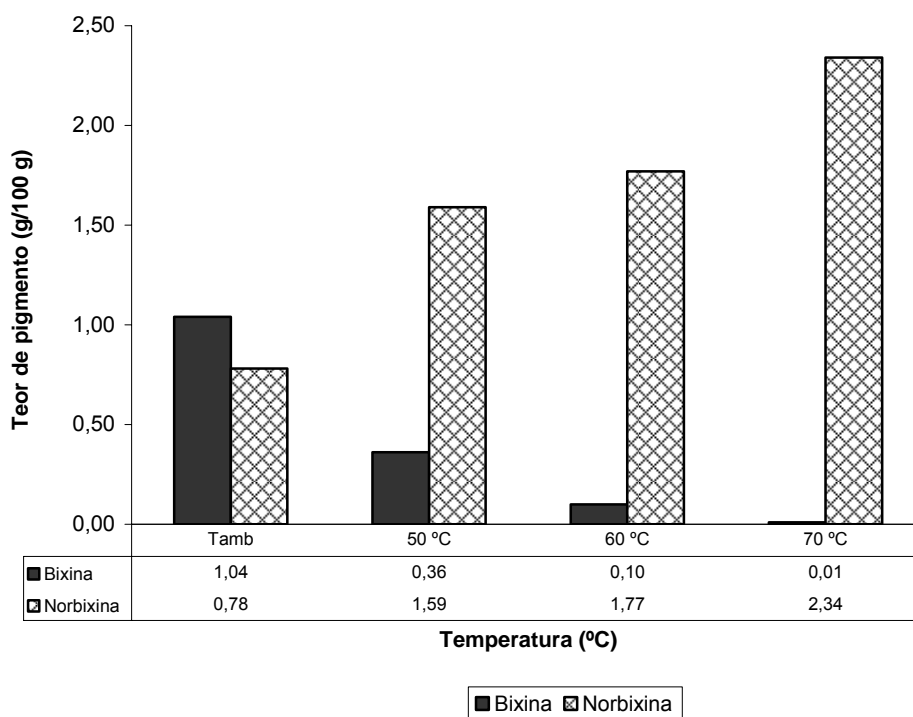


Figura 22: Teores de bixina e norbixina, obtidos por CLAE, para os extratos obtidos com KOH 4%, durante 1 h de extração, às temperaturas ambiente, 50, 60 e 70 °C.

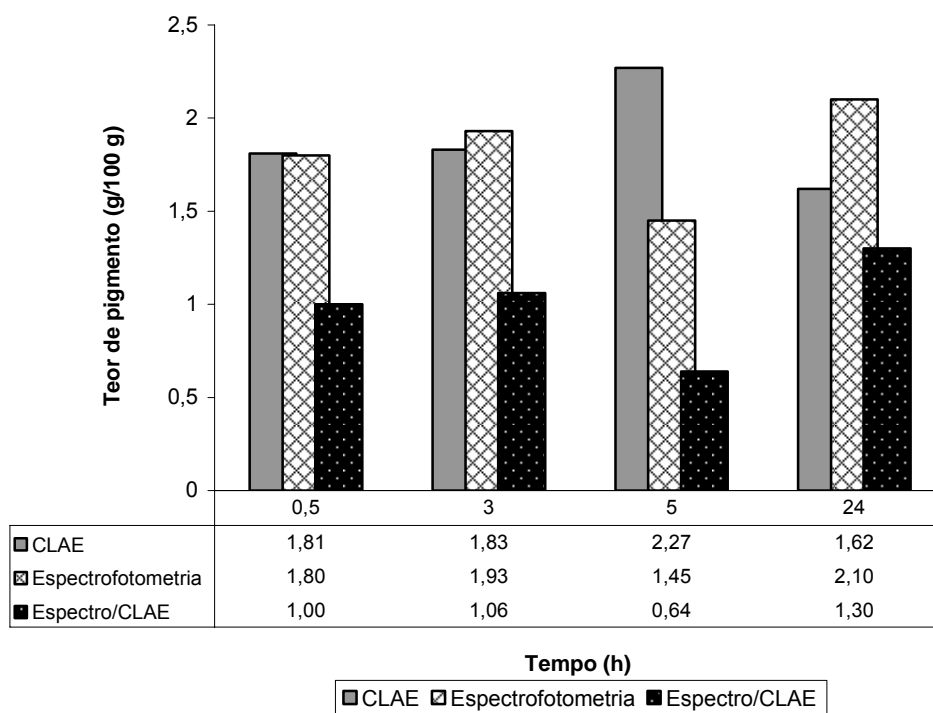


Figura 23: Bixinóides totais, obtidos por CLAE e por espectrofotometria, para os extratos obtidos com KOH 4%, durante 1 h de extração, às temperaturas ambiente, 50, 60 e 70 °C, e razão Espectro/CLAE.

De acordo com as Figuras 22 e 23, praticamente não houve aumento no teor de pigmentos totais extraídos quando se elevou a temperatura de extração. Aqui os resultados encontrados para os bixinóides totais por espectrofotometria foram mais elevados do que os encontrados pela CLAE, como era esperado de se ocorrer. A relação Espectro/CLAE variou a cada condição extratora, indicando uma menor convergência entre os dois métodos e, diante disso, se recomendaria o método da CLAE nesta quantificação.

4. CONCLUSÃO

A reação de hidrólise da bixina para formar o sal de norbixina é dependente da natureza do solvente alcalino utilizado. Algumas bases proporcionam saponificação completa, enquanto outras apenas uma saponificação parcial, gerando mistura de pigmentos (bixina e norbixina) no extrato.

Para a base hidróxido de potássio, o tempo exerceu pouca influência na reação de saponificação, quando se tratavam de soluções diluídas, que não promoveram a saponificação da bixina.

O aumento da concentração das soluções de KOH levou a uma maior conversão da bixina em norbixina e seu sal. Para soluções de KOH mais concentradas, quanto maior o tempo de extração, maior foi a concentração de norbixina formada no meio.

O uso de temperatura elevada em solução diluída de KOH aumentou a velocidade de saponificação, comparada à temperatura ambiente. Ainda, favoreceu a formação de isômeros e/ou de compostos de degradação. Em soluções mais concentradas de KOH, a temperatura favoreceu a formação de norbixina, e não a formação de isômeros.

Para a base hidróxido de amônio a 0,5 N, quanto maior o tempo de extração, maior foi a saponificação da bixina a norbixina. Nesta concentração, o tempo favoreceu a formação de isômeros e/ou de compostos de degradação.

O aumento das concentrações de NH_4OH não levou a um aumento na velocidade da reação de saponificação da bixina a norbixina.

O uso de temperaturas elevadas em solução de NH_4OH favoreceu a formação de isômeros e/ou de compostos de degradação, e não a conversão de bixina a norbixina.

Para a base NH_4OH , o tempo de extração foi o fator que mais influenciou na reação de saponificação. Para a base KOH , a concentração e a temperatura de extração foram os fatores que mais influenciaram na reação de saponificação de bixina a norbixina e seu sal.

Ambas as técnicas de espectrofotometria e de CLAE para quantificação dos pigmentos de urucum forneceram resultados satisfatórios, e deveriam ser utilizadas de acordo com a necessidade da análise. Para análises de rotina, se utilizaria espectrofotometria, e para análises mais completas dos pigmentos separadamente, se utilizaria CLAE.

CONCLUSÃO GERAL

Em termos da eficiência de extração dos pigmentos das sementes de urucum, o melhor solvente extrator avaliado foi o NH_4OH 0,5 N em etanol 60%, que possibilitou o teor mais baixo de pigmentos residuais nas sementes. Quanto ao teor de pigmentos extraídos, os solventes aquosos KOH 0,1 N e NH_4OH 0,5 N e o solvente alcoólico NH_4OH 0,5 N em etanol 60% apresentaram desempenhos semelhantes.

Os diferentes solventes extratores avaliados (KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial) influenciaram, também, no aumento da concentração de determinados compostos presentes nos corantes em pó e em pasta, como teores mais elevados de compostos nitrogenados ou maiores quantidades do mineral potássio.

As análises das coordenadas colorimétricas L^* , a^* e b^* possibilitaram a caracterização qualitativa e a diferenciação da cor de cada extrato e de cada corante concentrado produzido pelos diferentes solventes extratores e pelos diferentes métodos.

Pela técnica de espectroscopia de infravermelho foi possível detectar a presença da bixina nos corantes produzidos pelos solventes KOH 0,1 N, NH_4OH 0,5 N, NH_4OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial.

As metodologias de purificação e isolamento da bixina e da norbixina desenvolvidas neste trabalho apresentaram-se eficientes, de menor custo, se comparadas às metodologias já existentes, de rápida execução, e proporcionaram compostos com pureza acima de 90%, representando uma alternativa viável de produção de padrões de bixina e norbixina.

As técnicas de CLAE identificaram satisfatoriamente os pigmentos presentes nos corantes de urucum e, graças a esta técnica, pôde-se observar o não desenvolvimento da reação de saponificação de bixina a norbixina, nas condições de extração do estudo. A bixina foi o componente majoritário da extração dos pigmentos de urucum quando se utilizou tanto os solventes aquosos alcalinos (KOH 0,1 N e NH₄OH 0,5 N) quanto os solventes alcoólicos (NH₄OH 0,5 N em etanol 60% e etanol comercial).

No estudo da reação de saponificação da bixina para formar a norbixina e seu sal, verificou-se que o tipo de solvente alcalino utilizado influenciou na ocorrência, em maior ou menor extensão, da reação. Para a base NH₄OH, o tempo de extração foi o fator que mais influenciou no aumento da ocorrência da reação de saponificação. Para a base KOH, a concentração e a temperatura de extração foram os fatores que mais influenciaram no aumento da reação de hidrólise da bixina a norbixina e seu sal.

Ambas as técnicas de espectrofotometria e de CLAE para quantificação dos pigmentos de urucum retornaram resultados satisfatórios, devendo ser escolhidas de acordo com a necessidade da análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 1687–1693, 2004.

ALVES, R. W.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Extração por agitação mecânica de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), purificação e análise dos extratos por espectrofotometria e HPLC. **Simpósio Brasileiro do Urucum**. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2006. CD-ROM.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**, 2.ed. Viçosa-MG, Editora UFV. 1999. 416 p.

BAHL, C. P.; SESHADRI, T. R.; VEDANTHAM, T. C. Preparation of bixin and methylbixin from Indian seeds of *Bixa orellana*. **Current Science**, v. 2, p. 27-28, 1971.

BARBOSA FILHO, J. M. *Bixa orellana*: retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímicas e emprego na fitocosmética no continente americano. In: **Simpósio Brasileiro do Urucum**. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2006. CD-ROM.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 989-994, 2005.

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

BATISTA, C. L. L. C. **Produção e avaliação da estabilidade de corante hidrossolúvel de urucum**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

BAUTISTA, A. R. P. L.; MOREIRA, E. L. T.; BATISTA, M. S.; MIRANDA, M. S.; GOMES, I. C. S. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 625-629, 2004.

BHALKAR, S. V.; DUBASH, D. J. Methods of extraction of annatto from the seeds of *Bixa orellana*. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 36, n. 2, p. 157-161, 1983.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F. A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed., São Paulo-SP, Editora Varela. 1992. 234 p.

BRASIL. Resolução nº 44 – CNNPA, de 1977. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção e alimentos e bebidas. Diário Oficial da **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1 fev. 1978 e 24 abril 1978. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 22 maio 2007.

CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Correlação por análise multivariada entre propriedades antioxidantes e de cor de extratos de urucum. **XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Curitiba, PR. **Anais...** XX CBCTA, 2006. CD-ROM.

CARVALHO, P. R. N. Corantes de urucum hidrossolúveis. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 242-243, 1992.

CASTRO, M. S.; FARIA, L. J. G. Secagem de urucum em leito fixo: influência das variáveis operacionais no teor de bixina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v 1, n. 1, p. 137-144, 1992.

CHAO, R. R.; MULVANEY, S. J.; SANSON, D. R.; HSIEH, F.; TEMPESTA, M. S. Supercritical CO₂ extraction of annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts. **Journal of Food Science**, v. 56, n.1, p. 80-83, 1991.

CHRISTIAN HANSEN. **Determinação de bixina em suspensão oleossolúvel**. Sistema da Qualidade Assegurada, 2000, 4p. [a].

CHRISTIAN HANSEN. **Determinação de norbixina em produtos líquidos**. Sistema da Qualidade Assegurada, 2000, 4p. [b].

COLLINS, P. The role of annatto in food colouring. **Food Ingredients & Processing International**, Hertfordshire, UK: Turret Group plc. p. 23-27. 1992.

CONSTANT, P. B. L. **Antocianinas de açaí (*Euterpis oleracea* M.): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2003. 186 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa (UFV).

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.

DENDY, D. A. V. Annatto, the pigment of *Bixa orellana*. **East African Agricultural and Forestry Journal**, p. 121-126, oct., 1966.

FARIA, L. J. G.; COSTA, C. M. L. **Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais**. Belém: UFPA, Série POEMA, n. 7. 1998. 302 p.

FITOTERAPIA *Bixa orellana*. Disponível em: <<http://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/726.html>>, acesso em 31 outubro 2003.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138, 2003.

FRANCIS, F. J. Less common natural colorants. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural food colorants**. 2.ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996. p.310-335.

FRANCO, C. F. O. **Mercado de urucum (*Bixa orellana* L.) no Brasil**. EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S/A. Governo do Estado da Paraíba. 2003. Disponível em “www.emepa.org.br/urucum_mercado.php”. Acesso em 26 de novembro de 2003.

FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINÉLLI, I. S. C. **Urucuzeiro: Agronegócio de Corantes Naturais**. 1ª ed., Emepa, P.B., João Pessoa, 2002, 120 p.

GLÓRIA, M. B. A.; VALE, S. R.; BOBBIO, P. A. Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. **Food Chemistry**, v. 52, p. 389-391, 1995.

GOMES, J. C.; SILVA, M. H. L.; SILVA, C. O. **Análise de alimentos**. 2. ed. Viçosa: UFV, DTA: FUNARBE, 2003, 154 p.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. 2.ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996. p.40-79.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo. 1985. v.1.

LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α - and β -bixin, and α - and β -norbixin, and the determination of carminic acid in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 732, p. 394-398, 1996.

LEVY, L. W.; RIVADENEIRA, D. M. Annatto. In: LAURO, G. J.; FRANCIS, F. J. **Natural food colorants – science and technology**. IFT Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Inc., 2000, Cap. 6, p. 115-152.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T. de; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, 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.

MCKEOWN, G. G.; MARK, E. The composition of oil-soluble annatto food colors. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 45, n. 3, p. 761-766, 1962.

MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 193-196, 2001.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1379-1383, 1997.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 135-139, 1999.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; PFANDER, H.; BRITTON, G. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1201-1203, 1996.

MILLER, D. D. Atomic absorption and emission. In: NIELSEN, S. S. **Food analysis**. 2. ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1999. p. 425-442.

MONGE, A. F. Factibilidad industrial del achiote (*Bixa orellana*). **Politecnico**, v.1, n.1, p. 39-46, 1967.

NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). **Food Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 283-289, 1988.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Florianópolis-SC, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. 189 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

PASSOS, M. L.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; MASSARANI, G. Bixin powder production in conical spouted bed units. **Drying Technology**, v. 16, n. 9-10, p. 1855-1879, 1998.

PERIN, J. D. **Efeito de diferentes copigmentos sobre a estabilidade de antocianinas extraídas de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

PESSOA, F. I. P.; QUEIROZ, E. M.; COELHO, J. P.; NOBRE, B. P.; MENDES, R. L.; CARDOSO, M. A. T.; PALAVRA, A. F. Estudo do processo de obtenção de produtos de urucum utilizando fluidos supercríticos. **Simpósio Brasileiro do Urucum**. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2006. CD-ROM.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação de métodos de obtenção e de estabilidade de pigmentos de sementes de urucum**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 1995. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Influência da luz e do oxigênio sobre a estabilidade do norbixinato de potássio em presença de maltodextrina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 21-26, 1999. [a].

PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, 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. [b].

PONTES, L. V. **Avaliação sensorial e instrumental da cor de misturas em pó para refresco, bebida isotônica e gelatina utilizando corantes naturais**. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

PÓVOA, M. E. B. Extração do corante de urucum (*Bixa orellana* L.) com diversos solventes. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, n.1, p. 153-157, 1992.

PÓVOA, M. E. B., FRANCO, S. S., PARIZZI, F. E., FERREIRA, A. P. Estabilidade de corantes de urucum. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.2, n.1, p.136-145, 1996.

PRABHAKARA RAO, P. G.; SATYANARAYANA, A.; RAO, D. G. Effect of storage on the stability of water soluble annatto dye formulation in a simulated orange-RTS beverage model system. **Lebensmittel Weiss und Technology**, v. 35, p. 617-621, 2002.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. R. N. Efeito do pH na quantidade de bixina obtida em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 182-187, 1992.

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.). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 4, p. 819-828, 1993.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O. Extrato de urucum (*Bixa orellana* L.) obtido utilizando álcool etílico como solvente. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n.1, p. 63-74, 1992.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v.5, n.1, p. 47-56, 1980.

REDDY, A. N. Y. Annatto del manufacture. **My Forest**, v. 13, n. 3, p. 127-131, 1976.

REITH, J. F.; GIELEN, J. W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 861-864, 1971.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Determinação, por CLAE, de corante de urucum em salgadinhos extrusados. **XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Fortaleza, CE. **Anais...** XVIII CBCTA, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **Evaluation of assay procedures for the bixinoid pigments in annatto seeds and their derivatives**. Interim Report. Natural Resources Institute, Kent, UK. 1988. 31 p.

ROSA, L. C. C. **Corantes naturais em alimentos: preferência do consumidor e aplicação industrial**. Viçosa-MG, Universidade Federal de

Viçosa, 2004. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

RUIZ, H. V.; WOOD, G. P. The separation of annatto pigments by sephadex. **Tropical Science**, v.13, n.3, p. 211-214, 1971.

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.

SCOTTER, M. J. Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry**, v. 53, p. 177-185, 1995.

SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterization of the principal coloring components of annatto using HPLC with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**. v. 11, p. 301-315, 1994.

SCOTTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1031-1038, 1998.

SHUHAMA, I. K.; AGUIAR, M. L.; OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **Journal of Food Engineering**. v. 59, p. 93-97, 2003.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 561-566, 2001.

SILVA, J. H. V., ALBINO, L. F. T., GODÓI, M. J. S. Efeito do extrato de urucum na pigmentação da gema dos ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1435-1439, 2000.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C. **Desenvolvimento de técnicas de extração de pigmentos de urucum e avaliação econômica para a implantação de uma unidade industrial em pequena escala**. In: Produção de Alimentos: Busca de Soluções Para a Fome - Prêmio Jovem Cientista e Prêmio Jovem Cientista do Futuro - Edição 2004. Porto Alegre: Gráfica e Editora. Porto Alegre-RS. 2005. p. 145-171.

SMITH, P. R.; BLAKE, C. J.; PORTER, D. C. Determination of added natural colours in foods. III. Annatto. **Leatherhead Food R. A. Research Report**, v. 431, 1983.

SOUZA, E. C. **Estudo químico e físico-químico dos pigmentos do urucum (*Bixa orellana*) utilizando metodologia simplificada.** Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras, 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Lavras (UFLA).

STRINGHETA, P. C.; MASCARENHAS, J. M. O.; PONTES, L. V.; SILVA, J. N.; REIS, F. P. Determinação do teor de bixina em sementes do urucum (*Bixa orellana* L.) sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 47-52, 1999.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.

TOLEDO, O. T.; NAGEM, T. J.; ROCHA, C. M.; COSTA, L. M. da; MAGALHÃES, N. M.; STRINGHETA, P. C.; QUEIROGA, L. E.; KLING, M. G. H.; SILVA, V. H. Propriedades biológicas de los tintes naturales. **Ars Pharmaceutica**. v. 45, n. 1, p. 5-20, 2004.

WOOD, A.; BAKER, D. M.; COPPEN, J.; GREEN, C. L. **Bixinoid assay in annatto seed and its extracts: (i) an evaluation of methods and (ii) recommendations for sample handling.** Kent: Natural Resources Institute, 1991, 50 p.