



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A PRODUÇÃO DE CORANTE HIDROSSOLÚVEL DE URUCUM

Natália Queiroz **Volta**¹; Paulo Roberto Nogueira **Carvalho**²; Enieluce S. B. **Parra**³; Marta Gomes
da **Silva**⁴

Nº 14223

RESUMO - *As sementes de urucum são muito conhecidas na indústria alimentícia por apresentarem a bixina, um carotenoide muito utilizado como corante natural. Entretanto as sementes vêm adquirindo notoriedade por apresentarem também em sua composição outras substâncias, como o geranilgeraniol e os tocotrienóis, que podem ser responsáveis por várias das propriedades farmacológicas atribuídas ao urucum. Esse estudo propôs avaliar/otimizar a produção do corante de urucum e orientar o processo para o aproveitamento da fração lipídica. Para a realização do estudo foi utilizado um planejamento experimental com as variáveis: concentração de KOH, tempo de agitação, relação sementes/solvente. Com os dados obtidos, foi elaborado outro planejamento com as variáveis concentração de KOH e temperatura de processo. Os estudos indicaram que a concentração de KOH, temperatura de processo e a interação dessas variáveis, influenciaram de forma significativa na obtenção da fração lipídica e na obtenção do material insaponificável (geranilgeraniol e tocotrienóis).*

Palavras-chaves: *Bixa orellana*, óleo, extração, carotenoides, geranilgeraniol e tocotrienóis.

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP, nataliaqueirozv@gmail.com.

2 Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

3 Colaborador: Assistente Técnico de Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

4 Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP, martags@ital.sp.gov.br



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT - Annatto seeds are known in the food industry for having bixin, a carotenoid widely used as a natural dye. Further, the seeds are becoming well known for having in their composition other substances, such as tocotrienols and geranylgeraniol, which may be responsible for many of the pharmacological properties attributed to annatto. This study aimed to evaluate / optimize the production of the dye annatto and guide the process for the use of lipid fraction. For conducting the study, an experimental design was used with the variables: KOH concentration, agitation time, seed / solvent ratio. With the data obtained, was carried out a second experimental design with the variables KOH concentration and process temperature. The study showed that the KOH concentration, process temperature and the interaction of these variables had a significant effect in obtaining the lipid fraction and obtaining the unsaponifiable matter (geranylgeraniol and tocotrienols).

Key-words: *Bixa orellana*, oil, extraction, carotenoids, geranylgeraniol and tocotrienols.

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da medicina e das pesquisas nos últimos anos, está cada vez mais comum a busca por substâncias naturais de interesse farmacológico, com o objetivo de curar doenças, desenvolver medicamentos ou até mesmo para a produção de cosméticos, a fim de restringir o uso de aditivos sintéticos.

A semente do urucum (*Bixa orellana* L.) possui um carotenoide como pigmento principal, denominado bixina, que representa cerca de 90% dos corantes naturais utilizados no Brasil. No processo de obtenção de extratos hidrossolúveis ou lipossolúveis a partir de sementes de urucum, é separado uma fração lipídica, material insaponificável, que diminui a qualidade do corante final, mas que contem altos teores de substâncias como o geranylgeraniol e tocotrienóis. O geranylgeraniol, tem sido utilizado como coadjuvante na cura de doenças como o câncer (MYERS et al., 1997), no controle de crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2005) e *Trypanosoma cruzi* (MENNA-BARRETO et al., 2008) e como inibidor da *Mycobacterium tuberculosis* (VIK et al., 2007) e, os tocotrienóis, são substâncias que apresentam atividade antioxidante, mais conhecidos como vitamina E.

Este trabalho objetiva estudar a separação da fração lipídica durante a produção de corante hidrossolúvel a partir da semente do urucum.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Matéria prima



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As sementes utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, coletadas na safra de 2013 e conservadas em freezer, nas formas inteira e moída. As análises de umidade, lipídeos, tocotrienóis e geranilgeraniol foram realizadas com as sementes inteiras e moídas, a fim de verificar onde os compostos estavam mais concentrados na semente, porém, na extração da fração lipídica, foi utilizada a semente inteira.

Determinação de umidade e lipídios

As determinações de umidade e lipídios foram baseadas no método descrito por HORWITZ et al. (2010). Para a umidade, cinco gramas de sementes foram secas em estufa à $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e pesadas até peso constante. Na determinação de lipídios dez gramas de sementes foram colocadas em extrator tipo Soxhlet, mantidas em refluxo com hexano por 8 horas, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo com temperatura entre 60 a 65°C , o balão foi seco em estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, e o teor de lipídios calculado.

Geranilgeraniol e tocotrienóis

Na determinação de geranilgeraniol e tocotrienóis foi utilizado o mesmo preparo de amostra conforme descrito por TINTOTI et al. (2012). Em cerca de 2,0 g de sementes inteiras e ou trituradas foram adicionados solução etanólica 0,05% de pirogalol e 5 mL de solução de hidróxido de potássio 50% e mantido em banho-maria entre 80°C - 90°C por 30 minutos. A extração dos analitos foi com 4 porções de 20 mL, de forma seqüencial, com uso da solução de éter etílico, éter de petróleo e acetato de etila (60:30:05, v/v/v). As frações foram combinadas, e lavadas até pH neutro. O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio, diluído em 4 mL de n-hexano e filtrado em membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 μm .

Na determinação do teor de geranilgeraniol foi utilizada uma coluna C18 (250 mm x 4 mm, partículas de 5 μm) e fase móvel composta por metanol:acetato de amônio 50 mM (90:10, v/v) com uma vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ (da SILVA et al., 2010). A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos, com monitoração a 210 nm, e a quantificação foi com padronização externa e a identificação feita por comparação com o tempo de retenção do padrão analítico e pelos espectros obtidos pelo sistema de detecção (arranjo de diodos).

Os tocotrienóis foram resolvidos em coluna de fase normal de Si 60, 250 x 4 mm d.i., tendo como fase móvel n-hexano:acetato de etila:isopropanol (97,6:1,8:0,6, v/v/v) e vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, em sistema isocrático. A detecção foi com uso do detector de fluorescência e comprimentos de onda de excitação de 294 nm e emissão de 326 nm. A quantificação foi com uso de padrão externo composto por γ - e δ -tocotrienol (TINTOTI et al., 2012).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Carotenoides

O teor de bixina foi determinado conforme descrito por CARVALHO et al. (2010). Em cerca de 10 g de produto foram adicionados 60 mL de solução de saponificação (solução composta por óleo de mamona e hidróxido de potássio 45%) e mantido em ebulição por 1 minuto. Após esfriar, a massa foi corrigida para 250 g com água e uma alíquota foi diluída com solução de hidróxido de potássio 0,5% para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 453 nm. Na quantificação foi utilizado o coeficiente de absorção de 2850 unidades de absorbância.

Fração lipídica – planejamento experimental

A extração da fração lipídica foi realizada com as sementes inteiras e envolveu dois planejamentos experimentais. No primeiro planejamento experimental foi realizado um delineamento composto central com 3 fatores, 2 níveis e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. No segundo planejamento foi utilizado um delineamento com 2 fatores, 2 níveis e 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. No primeiro planejamento experimental, foi observada concentração de KOH, tempo de extração e proporção semente/solvente. De acordo com os resultados obtidos na análise de variância, foi realizado um segundo planejamento com as variáveis: concentração de KOH e temperatura de mistura. A relação semente/solvente usada foi 1:2 (m/v). O tempo no agitador mecânico foi fixado em 30 minutos. Os valores utilizados para cada fator estudado estão apresentados na Tabela 2.

Para a obtenção da fração lipídica foram utilizados cerca de 100g de sementes, que após a adição do solvente nas temperaturas estabelecidas pelos planejamentos, (Tabelas 2), foram colocadas sob agitação em um agitador mecânico (IKA Labortechnik, modelo RW20 DZM), com rotação entre 600rpm a 650rpm. Após essa etapa, o material foi filtrado, para separação das sementes, e colocada em banho termostatizado (Fisatom, modelo 553, com circulação de água) a 70°C por 15 minutos, para completar a saponificação dos pigmentos. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo (LS Logen Scientific) acoplado a uma bomba de vácuo (Alpax ME1C vacuumbrand). O resíduo foi diluído em 100 mL de clorofórmio p.a., homogeneizado e filtrado em papel filtro sob vácuo. O filtrado foi transferido para um balão previamente tarado e concentrado em evaporador rotativo para eliminar o clorofórmio. O balão com o resíduo foi mantido em dessecador por 24h e pesado em balança analítica (Shimadzu, modelo UX62004) para determinar o teor da fração lipídica do processo. Para a determinação do teor de carotenoides na fração lipídica, o resíduo foi diluído em 100 mL de clorofórmio, realizadas as diluições necessárias e a absorbância foi obtida em espectrofotômetro UV/visível (Varian, Cary 50).



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas determinações de umidade, lipídios, geranilgeraniol e tocotrienóis nas sementes inteiras, utilizadas no estudo, e trituradas estão apresentados na Tabela 1. A variação observada entre as sementes inteiras e trituradas pode ser devido a etapa de homogeneização, onde a redução de partículas pode levar ao aumento da umidade e perda de lipídios nas paredes do moinho.

As variáveis e resultados dos ensaios referentes ao primeiro e segundo planejamento estão na Tabela 2. No primeiro planejamento experimental foi observado que somente a concentração de KOH influenciou significativamente no processo, com maior produção de corante e saponificação dos lipídios (Tabela 3, Figura 1). No segundo planejamento (Tabela 4), a análise de variância dos resultados indicou falta de ajuste no modelo utilizado. Avaliando os resultados observa-se que essa falta de ajuste pode ser atribuída a uma excepcional precisão dos valores nos ensaios dos pontos centrais que não representam totalmente a complexidade dos ensaios realizados. Por isso, mesmo considerando essa falta de ajuste, os resultados foram considerados satisfatórios. A temperatura de extração apresentou influência significativa na extração de óleo das sementes de urucum, com os maiores rendimentos sendo observados quando se trabalhou em temperaturas mais elevadas (45°C). Não houve influência significativa no rendimento de extração pelo aumento da concentração de KOH, quando se trabalhou em temperaturas inferiores à ambiente (10°C) (Figura 2). Apesar da concentração de KOH não ter apresentado influência significativa na extração do óleo, a interação da concentração de KOH com a temperatura de extração foi bastante significativa. Os melhores rendimentos foram observados quando se trabalhou com uma concentração de KOH de 5% (m/v) e uma temperatura de 40°C.

TABELA 1: Sementes de urucum inteiras e trituradas: teores de umidade, lipídios, geranilgeraniol e tocotrienóis.

Determinação	Semente inteira	Semente triturada
Umidade (g/100g)	7,6 (0,5)	8,9 (0,1)
Lipídios (g/100g)	3,7 (0,1)	2,3 (0,1)
Geranilgeraniol (g/100g)	0,87 (0,05)	0,92 (0,05)
γ -tocotrienol (mg/100g)	42,3 (0,3)	53,9 (1,6)
σ -tocotrienol (mg/100g)	318 (5)	340 (15)



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

TABELA 2: Planejamento experimental: Concentração de hidróxido de potássio ([KOH]), tempo de agitação, relação sementes / solvente e temperatura do solvente; e resultados obtidos nos ensaios.

Plan.	Ensaio	Fatores				Fração lipídica	
		[KOH] (%)	Tempo (min)	Sem / Sol (g/mL)	Temp (°C)	Carotenoides (mg/100g)	Óleo ¹ (g/100g)
Primeiro	1	1	15	1/1	-	108	1,7
	2	5	15	1/1	-	21	1,35
	3	1	45	1/1	-	860	2,3
	4	5	45	1/1	-	15	0,94
	5	1	15	1/3	-	24	1,7
	6	5	15	1/3	-	19	1,15
	7	1	45	1/3	-	157	3,1
	8	5	45	1/3	-	19	1,5
	9 ²	3	30	½	-	17,5	1,7
	10 ²	3	30	½	-	30	1,33
	11 ²	3	30	½	-	39,6	1,8
Segundo	1	5	30	½	41	237	1,4
	2 ²	3	30	½	24	141	0,9
	3	1	30	½	43	222	1,1
	4	5	30	½	13	74	0,8
	5 ²	3	30	½	23	117	1
	6 ²	3	30	½	22	128	0,9
	7	1	30	½	12	216	0,9

¹ Massa óleo já descontado o teor de carotenoides; ² Ponto central; Plan., Planejamento; Sem / Sol, relação semente e solvente; Temp., Temperatura.

TABELA 3: Análise de variância referente ao primeiro planejamento.

	GL	SQ	QM	F	F _(α=5%)
Regressão	5	3,08571	0,61711	23,27	3,45
Resíduo	5	0,13259	0,02652		
Falta de ajuste	3	0,02079	0,00693	0,124	9,16
Erro Puro	2	0,11180	0,0559		
Total	10	3,2183			

GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = média das somas dos quadrados; F = distribuição F.



TABELA 4: Análise de variância referente ao segundo planejamento.

	GL	SQ	QM	F _(α=5%)
Regressão	1	0,28810	0,28810	36,1
Resíduo	5	0,03990	0,00798	
Falta de ajuste	3	0,03943	0,01314	56,3
Erro Puro	2	0,00046	0,00023	
Total	6			

GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = média das somas dos quadrados; F = distribuição F.

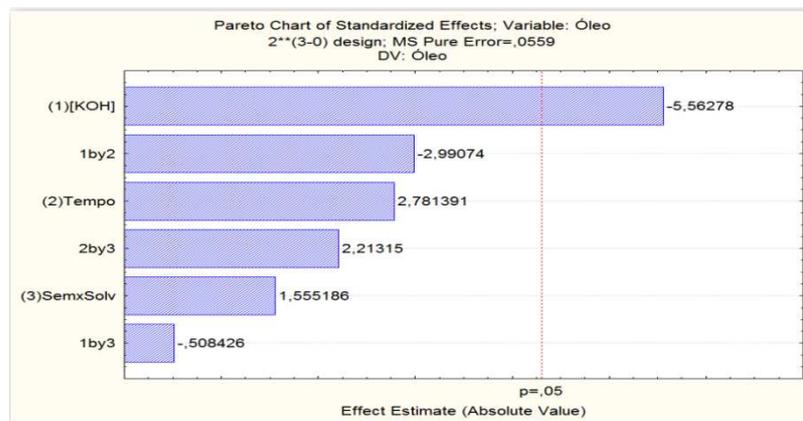


FIGURA 1: Gráfico de Pareto referente ao primeiro planejamento experimental.

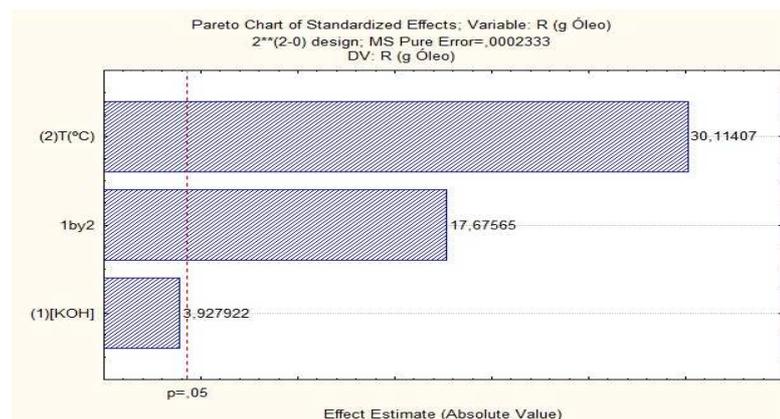


FIGURA 2: Gráfico de Pareto referente ao segundo planejamento experimental.

4 CONCLUSÃO

No primeiro planejamento experimental a concentração de KOH foi significativa no processo de obtenção da fração lipídica, e as demais variáveis, isoladas ou combinadas, não influenciaram. O segundo planejamento demonstrou a ação significativa da temperatura utilizada no processo,



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

bem como a interação entre o aumento da temperatura e a concentração de KOH. Com o estudo foi possível observar que existe uma relação importante entre a concentração de KOH e a temperatura utilizada no processo de obtenção do corante de urucum. Essa relação influenciou significativamente na obtenção da fração lipídica (material insaponificável) e na obtenção de geranylgeraniol e tocotrienóis de interesse farmacológico.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pela bolsa de iniciação científica e ao CCQA – ITAL, pelo estágio concedido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P. R. N.; DA SILVA, M. G.; FABRI, E. G.; TAVARES, P. E. R.; MARTINS, A. L. M.; PATTI, L. R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônomo (IAC). **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 519 – 524, 2010.

da SILVA, M.G.; LUIZ, F.A.; da ROCHA, F.W.; LEAL, R.N.; CARVALHO, P.R.N. Validação de método analítico de determinação de geranylgeraniol em sementes de urucum. In: **2º Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum**, Campinas, SP, 2010.

HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current through Revision 1, 2010.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAIISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.49, n. 5, p. 1770-1774, 2005.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; CASTRO, S. L. Anty-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive componente. **Parasitol. Res.** v. 103, p. 111-117, 2008

MYERS, C. E.; TREPEL, J.; SAUSVILLE, E.; SAMID, D.; MILLER, A.; CURT, G. Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes as cancer therapy. US Patent Nº 5.602.184, 1997.

TINTORI, F.R.P.; CARVALHO, P.R.; PARRA, E.S.B.; da SILVA, M.G. Avaliação dos teores de tocotrienóis em diferentes variedades de urucum (*Bixa orellana*, L.) 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012. Jaguariúna - SP, 13 a 15 de agosto de 2012. ISSN 978-85-7029-114-1.

VIK, A.; JAMES, A.; GUNDERSEN, L. Screening of terpenes and derivatives for antimycobacterial activity: identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **Plantamedica**, v.73, n. 13, p. 1410-1412, 2007.