

EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DAS SEMENTES DE *Bixa orellana* L.: UMA ALTERNATIVA PARA DISCIPLINAS EXPERIMENTAIS DE QUÍMICA ORGÂNICA

Charlyton Luis S. da Costa e Mariana H. Chaves*

Departamento de Química, Centro de Ciência da Natureza, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina - PI

Recebido em 1/10/03; aceito em 19/5/04; publicado na web em 9/9/04

EXTRACTION OF PIGMENTS FROM SEEDS OF *Bixa orellana* L.: AN ALTERNATIVE FOR EXPERIMENTAL COURSES IN ORGANIC CHEMISTRY. This paper describes methodologies for the extraction and characterization by TLC, UV-VIS, IR and NMR of bixin from *Bixa orellana* L. (urucum) seeds. Based on the results, the extraction with NaOH 5% is the fastest, uses low-cost materials, requires two to four laboratory hours and is a useful alternative for an experimental Organic Chemistry discipline.

Keywords: *Bixa orellana*; bixin; urucum.

INTRODUÇÃO

O uso de aditivos com a intenção de tornar os alimentos visualmente mais atraentes, seja na indústria alimentícia ou no uso doméstico cotidiano, é bastante comum. O corante extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), um arbusto nativo do Brasil e de outras regiões tropicais do planeta, recebe a denominação internacional de *annatto* (E160b)^{1,2} sendo largamente utilizado em várias partes do mundo em escala industrial, por conferir coloração atraente a uma extensa gama de produtos manufaturados³.

O *annatto* (anato) é uma mistura de pigmentos de coloração amarelo-laranja em consequência da presença de vários carotenóides, com predominância absoluta de um atípico, conhecido como bixina. Os maiores produtores mundiais de anato são Peru, Brasil e Quênia^{1,2}.

No Brasil, além do amplo emprego na indústria, a preparação comercial contendo 0,20-0,25% de bixina é conhecida como colorau, componente indissociável de inúmeros pratos da culinária brasileira. Este é produzido a partir das sementes de urucum, previamente aquecidas a 70 °C em óleo vegetal, seguido de abrasão com fubá ou farinha de mandioca ou pela mistura destas com urucum em pó, obtido por extração com solventes^{2,4}.

A bixina (Figura 1) possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular C₂₅H₃₀O₄. Representa 80% dos pigmentos da *Bixa orellana* L., ocorrendo apenas nesta espécie e em *Aristolochia cymbifera* Mart.^{2,5}.

A bixina ocorre naturalmente na forma 16-Z, porém durante o processo de extração é isomerizada conduzindo à forma 16-E, denominada isobixina⁵.

Vários outros carotenóides (C₁₉, C₂₂, C₂₄, C₂₅, C₃₀, C₃₂) foram isolados e identificados, porém constituem a parcela minoritária dos pigmentos. O constituinte majoritário das sementes de urucum é o geranilgeraniol, representando 1% das sementes secas⁶. A norbixina (C₂₄H₂₈O₄) é o derivado desmetilado da bixina que, apesar de ocorrer naturalmente, é quase sempre referida como produto da saponificação da bixina, sendo esta a sua forma de obtenção para fins comerciais^{1,7}.

As preocupações relacionadas ao impacto da utilização de corantes sintéticos sobre a saúde direcionam as atenções para o uso daqueles de origem natural, pela crença de que estes sejam desprovidos de efeitos

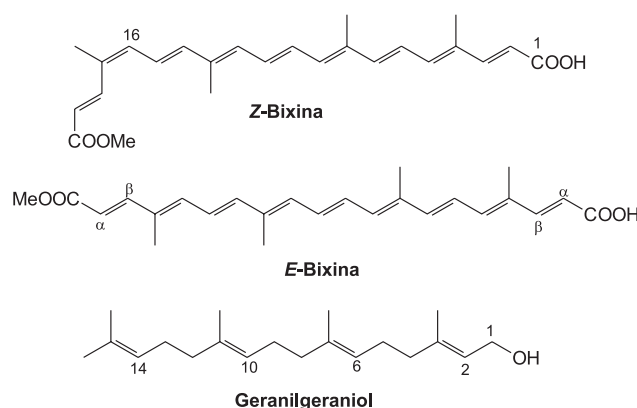


Figura 1. Substâncias presentes em sementes de *Bixa orellana*

tóxicos. A não exigência da apresentação de dados aprofundados referentes a análises toxicológicas e químicas para o registro de aditivos alimentares derivados de fontes naturais^{2,8}, certamente torna as informações relativas a possíveis efeitos indesejáveis e/ou atividades farmacológicas decorrentes do seu uso, muito mais escassas do que se poderia prever diante da importância do tema. No Brasil, o uso do urucum é tão rotineiro que sua inocuidade sequer é questionada.

Estudos toxicológicos recentes demonstraram que a norbixina, e em última instância a bixina, uma vez que esta é desmetilada *in vivo*, é destituída de efeitos deletérios significativos sobre células hepáticas, renais e da medula óssea de camundongos e ratos^{2,9} e, embora nenhum efeito embriotóxico tenha sido demonstrado em ratos⁸, um grau considerável de interferência com o controle metabólico da glicose nestes roedores foi percebido² e há relatos de uso popular da planta para tratamento do *Diabetes mellitus*⁸.

Os métodos de extração dos pigmentos da *Bixa orellana* L., seja para determinação da composição química ou averiguação de atividades sobre organismos vivos, são realizados com o uso de solventes, tais como propilenoglicol, óleo, água pura e soluções alcalinas¹⁰. Dependendo do solvente utilizado, a extração pode ser mais ou menos seletiva, de acordo com as conveniências de cada trabalho^{1,2,7}. Todavia, o extrato obtido necessita passar por um processo de purificação utilizando-se técnicas, reagentes e equipamentos que tornam tal procedimento demorado, dispendioso e distante dos objetivos de uma disciplina de Química Orgânica até mesmo de cursos de graduação.

*e-mail: mariana@ufpi.br

Com a intenção de proporcionar uma alternativa prática, acessível e com o forte “apelo cotidiano” que possui o corante de urucum, uma vez que a proximidade do dia-a-dia tende a prender as atenções e despertar interesses, propomos a extração das sementes de *Bixa orellana* L. com uma solução de hidróxido de sódio, sob condições ordinárias e sem necessidade de instrumental específico.

Com exceção da norbixina, que ocorre naturalmente em pequenas quantidades, a bixina, pigmento majoritário do anato, é o único dos carotenóides isolados e identificados (Figura 1) que possui um grupo carboxílico livre^{1,5,7}, sendo ele, portanto, um alvo potencial e seletivo para reação com NaOH e formação do sal da bixina, podendo a forma protonada ser reconstituída pela adição de um ácido.

A extração de sementes de urucum com NaOH é um procedimento rápido, de fácil execução e baixo custo, podendo ser executada em aulas práticas de Química Orgânica.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) foram adquiridas no Mercado Central de Teresina em fevereiro de 2003. Os espectros de UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Hytachi U3000 na região de 900 a 190 nm, utilizando solução de 20 ppm do extrato bruto em CHCl₃. Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX-500 com o uso de CDCl₃ como solvente e TMS como padrão de referência interno. O espectro na região do Infravermelho foi obtido em espectrômetro Bolmem FT-IR, modelo MB-102 utilizando partilhas de KBr. As placas cromatográficas foram preparadas com camadas de 0,25 mm de gel de sílica 60 da Vetec, eluídas em hexano-acetato de etila (8:2) e CHCl₃-MeOH (9:1). Os cromatogramas foram observados no visível antes e após as placas serem borrifadas com solução de sulfato cérico seguido de aquecimento.

Extração das sementes de urucum

Método 1: duas amostras de sementes de urucum (10 g) foram submetidas a extração, uma com acetona (40 mL) e outra com hexano (40 mL), à temperatura ambiente, por um período de 30 min, sob agitação freqüente. Separou-se as sementes por filtração e evaporou-se os solventes em evaporador rotativo.

Método 2: sementes de urucum (10 g) foram submetidas a extração com acetona em aparelhagem Soxhlet por um período de 1,5 h. Removeram-se as sementes por filtração e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo.

Método 3: duas amostras de sementes de urucum (10 g) foram submetidas a extração, uma com 40 mL de solução de NaOH 5% por 5 min e a outra com 40 mL de NaHCO₃ 10% por 30 min, sob agitação freqüente. Separaram-se as sementes por filtração, adicionou-se HCl concentrado à mistura alcalina até pH 4, filtrou-se usando papel

de filtro previamente pesado, lavou-se o sólido com água destilada até o pH neutro e secou-se o extrato em estufa a 70 °C por 30 min.

Caracterização da bixina

Os extratos de semente de urucum foram inicialmente analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) usando como eluentes hexano-acetato de etila (8:2) e clorofórmio-metanol (9:1). Cerca de 5 mg de cada extrato foram dissolvidos em 1 mL de H₂SO₄ concentrado para verificação da presença de carotenóides¹⁰. Aproximadamente 30 mg dos extratos obtidos com solução de NaOH e com acetona foram analisados por RMN ¹H e ¹³C, usando CDCl₃ como solvente.

Os extratos das sementes de urucum (10 mg) obtidos por extração com acetona à temperatura ambiente, acetona em Soxhlet e com NaOH foram dissolvidos em clorofórmio e as soluções resultantes tiveram seus volumes acertados para 100 mL com o mesmo solvente. Uma alíquota de 10 mL de cada solução foi retirada e diluída até 50 mL com CHCl₃, obtendo-se três soluções com concentração de 20 mg/L. Estas soluções foram analisadas no espectrofotômetro UV-Vis entre 900 e 190 nm e os respectivos espectros foram registrados e comparados com os da literatura³. A partir dos espectros obtidos determinou-se a concentração de bixina utilizando a expressão $A = abc$, onde A representa a absorbância da solução clorofórmica do extrato, lida no espectrofotômetro, c é a concentração de bixina na solução (g/L), b é o caminho ótico (1 cm) e a é o coeficiente de absorção da bixina em CHCl₃ (2826) no λ_{\max} 470 nm descrito por Mercadante⁴. O rendimento de bixina foi determinado considerando-se a massa do extrato obtida em cada extração.

A relação bixina/geranilgeraniol foi determinada dividindo-se o valor da integração de um dos sinais de H- β aos grupos carboxílicos da bixina pelo valor da integração do sinal de H-1 do geranilgeraniol e multiplicando-se por 2¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração das sementes de *B. orellana* teve como finalidade escolher qual seria o melhor solvente para a extração da bixina. O hexano e a solução de NaHCO₃ a 10% não se mostraram eficientes, os rendimentos obtidos foram 0,22 e 1,56%, respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). Os solventes que se mostraram mais eficientes foram acetona em Soxhlet e a solução de NaOH 5%. Apesar do rendimento de extrato bruto obtido com acetona em Soxhlet ter sido o maior (6,16±0,28), o rendimento de bixina, determinado por espectrometria UV-Vis neste extrato (1,31±0,43%), foi menor que o determinado no extrato bruto preparado com solução de NaOH 5% (3,10±0,09%), conforme apresentado nas Figuras 2 e 3 e Tabela 1. Além disso, outras substâncias extraídas com acetona podem afetar a quantificação da bixina, e ainda, o tempo gasto na extração com acetona em Soxhlet foi superior ao da extração com solução de NaOH 5%. Vale ressaltar que outros carotenóides podem ser detectados

Tabela 1. Resultados obtidos na extração das sementes de *Bixa orellana* por diferentes solventes

Método de extração	Massa de sementes/g	Tempo de extração/min	Massa extraída/mg	Rendimento da extração/%	Rendimento de bixina/%*	Relação bixina/geranilgeraniol‡
Acetona	10	30	498,67±5,86	4,99±0,06	1,18±0,45	1:3
Hexano	10	30	22	0,22	ND	ND
Acetona (Soxhlet)	10	90	616±28,28	6,16±0,28	1,31±0,43	1:3
NaOH 5%	10	5	493,07±31,87	4,93±0,32	3,10±0,09	1:2
NaHCO ₃ 10%	10	30	156	1,56	ND	ND

*Determinado por UV-Vis em relação à massa de extrato; ND: não determinado; ‡ determinada por RMN ¹H.

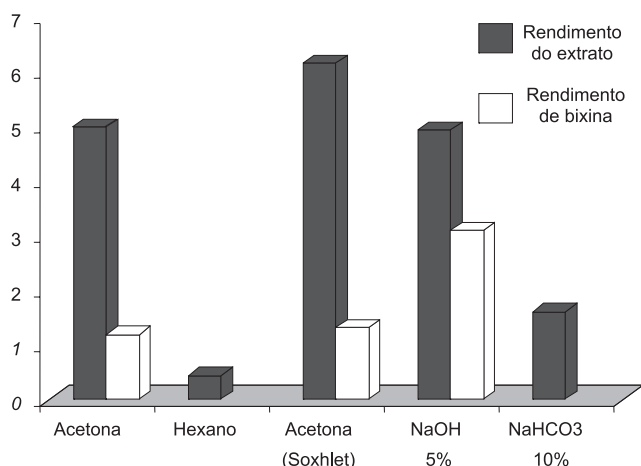


Figura 2. Gráfico da porcentagem de extratos e de bixina das sementes de *Bixa orellana* obtidos com diferentes solventes

concomitantemente com a bixina na análise por UV-Vis, contudo, como mencionado anteriormente, a ocorrência desta nas sementes de urucum é da ordem de 80% do total dos pigmentos existentes².

A literatura registra uma concentração média de bixina nas sementes de urucum variando entre 1,2-2,3%, no entanto, o rendimento pode estar sujeito ao tipo de solvente usado na extração e a fatores ambientais, tais como temperatura, iluminação, índice pluviométrico e tipo de solo^{5,10}. Os resultados obtidos permitiram eleger a solução de NaOH 5% como o solvente ideal para a obtenção do extrato.

O tratamento do extrato com H₂SO₄ concentrado resultou no desenvolvimento de coloração azul esverdeada, característica da presença de carotenóides¹¹.

A realização de CCDC usando como eluente hexano-acetato de etila (8:2) teve por finalidade a verificação da existência de constituintes menos polares nos extratos, enquanto que o uso de CHCl₃-MeOH (9:1) foi para eluição dos constituintes mais polares, como a bixina. Para o primeiro cromatograma obtido observou-se que apenas uma pequena parcela do material foi eluído, resultando em uma mancha uniforme, de formato alongado, coloração laranja, com R_f abaixo de 0,5 e que sugere ser de carotenóides com grupamento ácido. Este resultado permite ainda deduzir que carotenóides menos polares, tipo β-caroteno, devem estar presentes em pequenas quantidades, uma vez que não se observou manchas com características deste tipo de substâncias. O segundo cromatograma mostrou que grande parte do material foi eluído, originando manchas de formato alongado, coloração laranja, distribuídas por toda a placa, ficando a zona de maior concentração com R_f de aproximadamente 0,4 e coloração vermelho-alaranjada, que sugere ser a bixina.

Os espectros de UV-Vis (Figura 3) dos extratos de urucum mostraram-se semelhantes aos relatados para a bixina³.

A presença da bixina nos extratos acetônicos e em solução de NaOH 5% foi comprovada através da análise dos espectros de RMN ¹H mediante observação de dois pares de dubletos em δ 5,89/7,98 (J=15,8 Hz) e δ 5,93/7,47 (J=15,5 Hz) atribuídos, respectivamente, a H-α/H-β aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster, juntamente com o singlete em δ 3,80 de metoxila de éster⁵. O espectro de RMN ¹³C também confirmou a presença da bixina, pelos sinais de carbono da metoxila de éster (δ 51,6), e dois sinais em δ 171,8 e 168,0 referentes às carbonilas de ácido e éster, respectivamente⁵.

Os espectros de RMN dos extratos acetônicos e em solução de NaOH 5% mostraram que o diterpenóide geraniogeraniol foi o componente majoritário das sementes de urucum, conforme relatado na

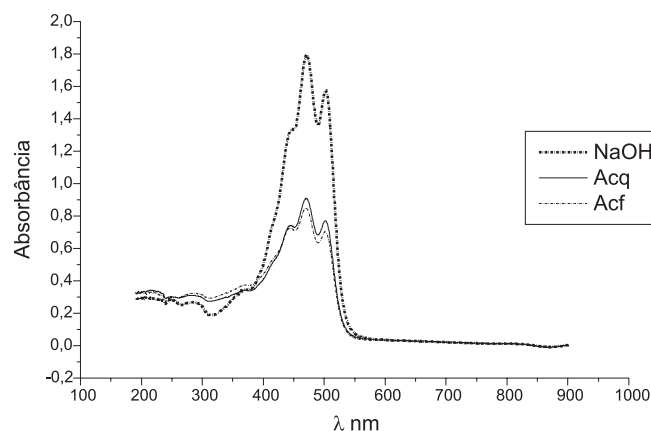


Figura 3. Espectro UV-Vis das soluções de extrato das sementes de *Bixa orellana*; Solvente: CHCl₃; NaOH: extração com solução de NaOH 5%; Acq: extração com acetona em Soxhlet; Acf: extração com acetona a frio

literatura⁶. Os sinais observados no espectro de RMN ¹H que caracterizam o geraniogeraniol (Figura 4) são: δ 4,18 (d, 6,7 Hz, H-1), δ 5,43 (tl, 6,8 Hz, H-2), δ 5,12 (sl, H-6, H-10 e H-14), δ 1,62 (s, 3CH₃) e δ 1,70 (s, 2CH₃), contudo, no espectro de RMN ¹³C os sinais característicos para esta substância ocorrem em δ 59,4 (CH₂, C-1), δ 139,9, 135,4, 134,0, e 131,3 (carbonos olefínicos não hidrogenados), δ 124,4, 124,2, 123,7 e 123,2 (carbonos metínicos olefínicos) e os situados entre δ 39,7-16,0 (carbonos saturados não oxigenados)^{6,13}.

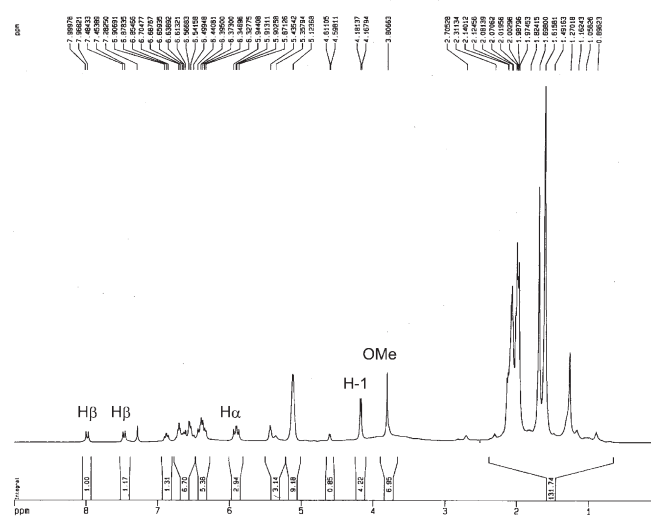


Figura 4. Espectro de RMN ¹H do extrato de sementes de *Bixa orellana* em solução de NaOH 5% (CDCl₃, 500 MHz)

A relação bixina/geraniogeraniol, determinada através do espectro de RMN ¹H, foi 1:3 nos extratos acetônicos e 1:2 no extrato preparado com solução de NaOH (Tabela 1). Estes resultados foram compatíveis com o percentual de bixina determinada por UV-Vis nos extratos, considerando-se que devem existir outras substâncias além da bixina e geraniogeraniol no extrato de urucum.

O espectro na região do infravermelho (IV) do extrato obtido com solução de NaOH 5% de sementes de urucum (Figura 5) apresenta banda larga e forte na região de 3500-2500 cm⁻¹ de estiramento O-H de álcool, atribuído ao geraniogeraniol, sobreposta à banda de

estiramento O-H de ácido. Esta última juntamente com a banda forte de estiramento de carbonila de éster α,β -insaturado (1717 cm^{-1}) contendo um ombro que sugere ser de outra carbonila, são indicativos da presença de bixina. O espectro apresenta ainda, entre outras, bandas de estiramento C=C ($1608, 1600$ e 1563 cm^{-1}), C-H sp^3 ($2856, 2919$ e 2969 cm^{-1}), C-H sp^2 (3031 cm^{-1}), C-O de álcool primário (1161 cm^{-1}) e deformação C-H de olefinas (1006 e 964 cm^{-1}). Estes dados mostraram-se compatíveis com os relatados na literatura para as duas substâncias^{5,6}.

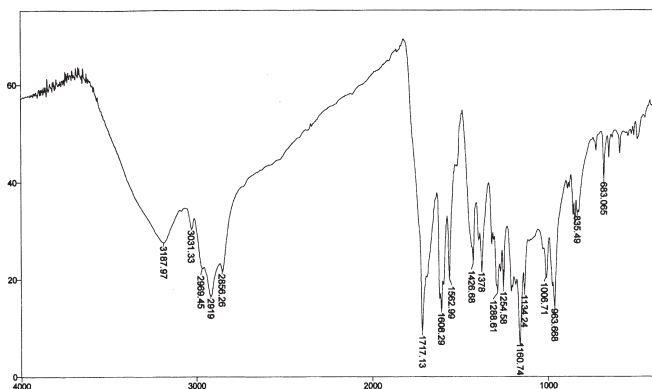


Figura 5. Espectro na região do infravermelho do extrato de sementes de *Bixa orellana*

A extração do geraniol, uma substância neutra, da semente de urucum, com solvente quimicamente ativo pode ser questionada, porém, este fato pode ser justificado considerando que esta substância foi arrastada, por ação de lavagem, pela solução de hidróxido de sódio¹⁰.

O experimento da forma como está sendo proposto neste trabalho, iniciando-se com a extração seguida de análise por UV-Vis, RMN e IV, poderá ser executado em aulas de Química Orgânica e Química Analítica de cursos de graduação. Opcionalmente, quando não se dispuser do equipamento, poderá ser omitida a análise por RMN, pois a espectrometria na região do infravermelho permite confirmar a presença de bixina e geraniol no extrato.

A simples extração das sementes com determinação do rendimento, como forma de adaptação às condições locais, poderá ser realizada até mesmo em aulas do ensino médio, usando materiais alternativos como soda cáustica e álcool ou acetona comerciais.

Além dos cálculos sobre o rendimento da bixina e a relação bixina/geraniol, alguns questionamentos poderão ser levantados para discussão em sala, tais como o porquê da bixina ter sido extraída em maior concentração com solução de NaOH; as razões pelas quais a bixina absorve luz com λ_{max} 470 nm; a cor observada para bixina, considerando a cor e o comprimento de onda da luz absorvida¹⁴ e as razões de se observar coloração azul pelo tratamento do extrato de urucum com ácido sulfúrico concentrado¹⁵.

CONCLUSÃO

O método de extração de sementes de urucum com solução de hidróxido de sódio descrito neste trabalho conduziu ao melhor rendimento de bixina quando comparado à extração com acetona, à temperatura ambiente e em Soxhlet, e permite sua implementação em disciplinas que dispõem de períodos curtos de aula, ficando a caracterização da bixina por UV-Vis, RMN e IV e a discussão para serem realizadas em aulas posteriores. Além disso, somente a extração não necessita de instrumentação sofisticada, podendo ser realizada inclusive no ensino médio utilizando materiais de baixo custo e de fácil aquisição. De forma opcional, o experimento pode ser montado incluindo também a extração com acetona à temperatura ambiente e em Soxhlet, a ser executado por diferentes equipes, com o objetivo de comparar os rendimentos e com enfoque na discussão dos conceitos de extração contínua e maceração com solvente quimicamente ativo.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/PROCAD pelo apoio financeiro e bolsa de C. L. S. da Costa; ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da RMN (CENAUREMN/UFC) pela execução dos espectros.

REFERÊNCIAS

- Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Rodrigues-Amaya, D.; Pfander, H.; Briton, G.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1201.
- Fernandes, A. C. S.; Almeida, C. A.; Albano, F.; Laranja, G. A. T.; Felzenszwalb, I.; Lage, C. L. S.; de Sá, C. C. N. F.; Moura, A. S.; Kovary, K.; *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 411; Araújo, J. A.; *Química de alimentos: teoria e prática*, 2ª. ed., Ed. UFV: Viçosa, 1999.
- Oliveira, L. F. C.; Dantas, S. O.; Vellozo, E. S.; Santos, P. S.; Ribeiro, M. C. C.; *J. Mol. Struct.* **1997**, *435*, 101.
- Mercadante, A. Z.; Tocchini, L.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2001**, *21*, 310.
- Sousa, P. S.; Matos, M. E. O.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*, Ed. UFC: Fortaleza, 1991.
- Jondiko, I. J. O.; Pattenden, G.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3159.
- Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H.; Briton, G.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1379; Mercadante, A. Z.; Steck, A.; Pfander, H.; Briton, G.; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 135.
- Paumgarten, F. J. R.; De-Carvalho, R. R.; Araújo, I. B.; Pinto, F. M.; Borges, O. O.; Souza, C. A. M.; Kuriyama, S. N.; *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1595.
- Lima, R. O. A.; Azevedo, L.; Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 189.
- Shuhama, I. K.; Aguiar, M. L.; Oliveira, W. P.; Freitas, L. A. P.; *J. Food Engin.* **2003**, *59*, 93.
- Ikan, R.; *Natural Products: A Laboratory Guide*, 2ª ed., Academic Press: San Diego, 1991.
- Chaves, M. H.; Barbosa, A. S.; Moita Neto, J. M.; Aued-Pimentel, S.; Lago, J. H. G.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 404.
- Rahman, A.; Ahmad, V. U.; *¹³C of Natural Products: Diterpenes*, Plenum Press: New York, 1992.
- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; *Introduction to Spectroscopy*, 3ª ed., Brooks/Cole: Australia, 2001.
- MacBeath, M. E.; Richardson, A. L.; *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 1093.