



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ROTA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DAS SEMENTES DE URUCUM (*BIXA ORELLANA L.*).**

EZEQUIEL DA CRUZ LIMA

Orientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana.
Co-Orientadora: Prof. Dra. Deuzuíta dos Santos Freitas Viana.

TERESINA
2023

EZEQUIEL DA CRUZ LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ROTA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DAS SEMENTES DE URUCUM (*BIXA ORELLANA L.*).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processamento e Caracterização de materiais.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

Co-Orientadora: Prof. Dra. Deuzuíta dos Santos Freitas Viana.

TERESINA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Lima, Ezequiel da Cruz

L732d Desenvolvimento de uma nova rota de extração de compostos bioativos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) / Ezequiel da Cruz Lima. - 2023.
89 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, 2023.

Orientador : Prof Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

1. Bixina. 2. Carotenoides. 3. Solventes. I.Título.

CDD - 620.1

Elaborado por Tanize Maria Sales CRB 3/1024

EZEQUIEL DA CRUZ LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ROTA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DAS SEMENTES DE URUCUM (*BIXA ORELLANA L.*).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processamento e Caracterização de materiais.

Aprovada em: 05/10/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana (Orientador)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI

Prof. Dr. Haroldo Reis Alves Macêdo (Avaliador Interno)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI

Profa. Dra. Mirna Sales Loiola Rosa (Avaliadora Externa)

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Dedico este trabalho a Deus que me capacitou para que eu chegasse até aqui. Aos meus pais, meus primeiros e eternos mestres. Aos meus irmãos, a minha afilhada e a minha noiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, que todos os dias me ensina pacientemente que a ciência só tem sentido se acompanhada de fé, esperança, e principalmente de amor.

Desejo agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana e a minha coorientadora Prof. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana, sua orientação valiosa, paciência e insights críticos ao longo de todo o processo de pesquisa. Sua orientação foi fundamental para o sucesso deste projeto.

Aos Prof. Dra. Mirna Sales Loiola Rosa, Dr. Haroldo Reis Alves Macêdo, Dr. Gilvan Moreira da Paz, pelas contribuições que ajudaram a enriquecer esse trabalho, bem como ao então secretário Francílio e ao Prof. Dr. Rafael Lisandro pelas análises de FTIR essenciais para a caracterização das minhas amostras e todo o corpo docente do PPGEM.

Aos meus queridos pais, Maria Anete e Manoel Pereira, por todas as orações e todo o suporte e paciência necessários, não só durante essa etapa, mas em todos os momentos da minha vida pessoal e acadêmica, que desde de sempre me incentivaram na busca dos meus objetivos.

Aos meus irmãos Edna, Ezequias e em especial ao Emanuel que é minha fonte de inspiração, dedicação, esforço e comprometimento, obrigado por terem entendido meus momentos de ausência durante esse período. A minha afilhada Serena Maria que nos momentos de angústia chegava com toda a sua doçura para aliviar o estresse. A minha noiva Hercília, sinônimo de paciência, carinho, zelo, pureza e por todo incentivo, fundamentais que me fizeram seguir em frente nessa trajetória.

A todos os Meus colegas de turma do PPGEM e em especial ao Jean, Ernane, Emerson, Teresa, Gecivaldo, Isabel, Lucas, Aurélio, Leandro e Janiel, que me ajudaram muito do ponto de vista das ideias construídas e dos momentos de descontração ao longo desse trabalho. A Liduína e André por estarem sempre à disposição nas análises realizadas para a minha pesquisa, todos foram uma fonte constante de inspiração e colaboração. Suas discussões e trocas de ideias enriqueceram significativamente este trabalho.

Agradeço a Instituição de Ensino IFPI e ao PPGEM pois me deram a oportunidade de adquirir conhecimento essencial para a minha qualificação profissional.

Jamais poderia deixar de agradecer aos meus amigos pessoais e profissional que fiz na cidade de Coroa - Ma, Assis, Anderson, Gercilano e em especial ao Ivan pela sua amizade, por seu apoio incondicional e por entenderem as vezes em que eu tive que me ausentar para me concentrar neste projeto.

RESUMO

As sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) são ricas em compostos bioativos pigmentares como a bixina, geranilgeraniol, tocotrienóis e compostos fenólicos, com aplicação na industrial e na saúde. Vários solventes têm sido usados para extração e quantificação de compostos do urucum, mas nenhum estudo sistemático de interações composto-solvente e seu impacto na extração e quantificação com diferentes solventes polares e apolares foi encontrado. O uso de solventes foi proposto por ser um processo alternativo mais rápido, barato e seguro. Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi desenvolver uma nova rota de extração de compostos bioativos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) com solventes polares e apolares. A extração dos compostos bioativos foi realizada sob refluxo (sistema Soxhlet) utilizando como solventes água, hexano (P.A), clorofórmio (P.A) e álcool etílico (P.A). A fim de uma possível viabilidade da metodologia desenvolvida, foi comparado com o método utilizado na literatura. Os compostos obtidos foram caracterizados pelas técnicas de Uv-Vis, FTIR, TG/dTG, DSC e MEV. As sementes residuais (com tratamento), *in natura* (sem tratamento) e as cinzas foram analisadas por FRX. Na etapa da extração com água o material obtido apresentou coloração escura, quando dissolvido sua tonalidade ficou amarelada, possui um aspecto higroscópico e um aroma adocicado, com o hexano observou-se duas fases de características oleosas, uma menos densa de coloração vermelha e outra de coloração laranja, na etapa da extração com clorofórmio e álcool verificou-se a bixina, um material de coloração violeta com polaridade intermediária e que se dissolve em clorofórmio e álcool. A rota de extração de compostos bioativos realizada foi viável economicamente, rápida, segura e satisfatória do ponto de vista dos produtos extraídos para uma possível aplicação.

Palavras-chave: Bixina; Carotenoides; Solventes.

ABSTRACT

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) are rich in pigmentary bioactive compounds such as bixin, geranylgeraniol, tocotrienols and phenolic compounds, with applications in industry and health. Various solvents have been used for extraction and quantification of annatto compounds, but no systematic study of compound-solvent interactions and their impact on extraction and quantification with different polar and nonpolar solvents has been reported. The use of solvents was proposed because it is a faster, cheaper and safer alternative process. Given the above, the objective of the research was to develop a new route for extracting bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa orellana* L.) with polar and non-polar solvents. The extraction of bioactive compounds was carried out under reflux (Soxhlet system) using water, hexane (P.A), chloroform (P.A) and ethyl alcohol (P.A) as solvents. In order to analyze the feasibility of the methodology developed, we compared it with the method used in the literature. The compounds obtained were characterized by UV-Vis, FTIR, TG/dTG, DSC and SEM techniques. Residual seeds (with treatment), fresh seeds (without treatment) and ash were analyzed by XRF. In the water extraction stage, the material obtained presented a dark color, when dissolved its tone became yellowish, has a hygroscopic appearance and a sweet aroma, with hexane two phases with oily characteristics were observed, a less dense one with a red color and another with a orange color, in the extraction stage with chloroform and alcohol, bixin was found, a violet-colored material with intermediate polarity that dissolves in chloroform and alcohol. The bioactive compounds extraction route carried out was economically viable, fast, safe and satisfactory from the point of view of the extracted products for a possible application.

Keyword: Bixin; Carotenoids; Solvents

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- O urucuzeiro (a) e as sementes de urucum (b)	17
Figura 2- Cachopa de urucum (a) Semente inteira e em corte (b)	18
Figura 3- Fórmulas estruturais do Licopeno (a) Luteína (b) e Bixina (c)	20
Figura 4- Comprimento da conjugação e cor de alguns carotenóides	21
Figura 5- Estruturas moleculares alguns isômeros da Bixina	23
Figura 6- Estrutura química dos tocotrienóis e tocoferóis respectivamente	24
Figura 7- Fórmula estrutural do Geranilgeraniol.....	25
Figura 8- Reações químicas para obtenção do corante (norbixina) de urucum utilizando soluções alcalinas	34
Figura 9-Fluxograma das Etapas experimentais realizadas na pesquisa	36
Figura 10-Resumo dos procedimentos realizados para a extração do material...	39
Figura 11-Processo de extração de composto bioativos segundo norma	41
Figura 12-Solução corante filtrada de semente de urucum (esquerda) e extrato alcalino da semente de urucum (direita).....	42
Figura 13 - Materiais obtidos durante as etapas da extração: extração água (a); extração Hexano (b); extração Hexano (c); extração Clorofórmico (d); extração Álcool (e)	49
Figura 14- Sementes de urucum in natura (a) e tratada (b)	49
Figura 15-Gráfico do Espectros de FTIR dos materiais extraídos das sementes de urucum (Bixa Orellana L.) nas etapas de água (Amostra 1) e hexano (Amostra 2) e do pó de bixina (Amostras 3A, 3B, 4A, 4B.....	50
Figura 16-Espectro de absorção UV-Vis das amostras extraídas com água (amostra 1) e hexano (amostra 2 A) (a) e das amostras de bixina (b)	54
Figura 17- Gráfico do Espectro de absorção de bixina em hidróxido de potássio (KOH) com comprimento de onda em 453 nm: Lote da semente Água/etapa água (a); Lote da semente Hexano/ etapa Álcool e Clorofórmio (b); Lote da semente Álcool/ etapa Álcool e Clorofórmio (c).....	66
Figura 18-Gráfico (a) TG e (b) dTG dos compostos extraídos das sementes de urucum (Bixa Orellana L.)	69
Figura 19- Gráfico da Analise térmica por DSC dos compostos extraídos das sementes de urucum (Bixa Orellana L	71
Figura 20 - Sementes de urucum in natura (A) e tratada (B).....	72

Figura 21- Cinzas das sementes de Urucum	72
Figura 22- MEV das bixina: ampliação de 5000x	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos matérias obtidos em cada etapa da extração e suas siglas.....	37
Quadro 2 - Sequência de solvente utilizados	40
Quadro 3 - Materiais líquidos extraídos em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b,d, f, h)	58
Quadro 4 - Materiais sólido extraídos após secagem em estufa em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b, d, f, h), utilizando como branco Clorofórmio.....	60
Quadro 5 - Materiais sólido extraídos após secagem em estufa em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b, d, f, h), utilizando como branco Álcool.....	61
Quadro 6 - Ilustra que só foi possível a determinação dos teores de carotenoides totais expressos em bixina no lote da semente água / etapa clorofórmio; lote da semente hexano / etapa clorofórmio e álcool e lote da semente álcool / etapa álcool e clorofórmio.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das sementes de urucum	19
Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados.....	37
Tabela 3 - Atribuições para as bandas de absorção do material extraído com água	51
Tabela 4 - Atribuições para as bandas de absorção do material extraído com hexano	52
Tabela 5 - Atribuições para as bandas de absorção da bixina	53
Tabela 6 - Análise de cinzas	63
Tabela 7 - Composição da parte inorgânica das Sementes de Urucum	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Chemical Society
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
dTG	Derivada de Análise Termogravimétrica
EDS	Espectroscopia de Dispersão em Energia
FRX	Fluorescência de Raios-X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFPI	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nd	Nada determinado
P.A	Para Análise
PPGEM	Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais
TG	Análise Termogravimétrica
UV/Vis	Espectroscopia Ultravioleta/Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
N ₂	Nitrogênio
P _c	Pressão Crítica
T _c	Temperatura Crítica
λ _{max}	Comprimento de Onda Máximo
cm ⁻¹	Centímetro a menos um
nm	Nanômetros
g	Gramas
L	Litros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Geral	16
1.1.2 Específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO URUCUM.....	17
2.2 CAROTENOIDES.....	19
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO URUCUM E SUAS APLICAÇÕES	21
2.3.1 Bixina.....	22
2.3.2 Tocotrienóis e Tocoferóis.....	24
2.3.3 Geranylgeraniol	25
2.3.4 Aplicações dos compostos bioativos da semente do urucum na indústria de Alimentos.....	26
2.3.5 Aplicações dos compostos bioativos na Saúde	26
2.3.6 Aplicações compostos bioativos diversas na indústria	29
2.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DO URUCUM	30
2.4.1 Atrito e secagem em leito de jorro.....	31
2.4.2 Raspagem e peneiramento.....	31
2.4.3 Extração com óleos vegetais	32
2.4.4 Extração com solventes	33
2.4.5 Extração com soluções alcalinas	33
2.4.6 Extração com CO ₂ supercrítico	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 QUÍMICA E REAGENTES.....	37
3.2 ETAPAS DAS EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	37
3.3 METODOLOGIA PADRÃO DE REFERENCIA	39
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EXPRESSOS EM BIXINA POR ESPECTROFOTOMETRIA	41
4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS EXTRAÍDOS	44
4.1 DE ACORDO COM METODOLOGIA PROPOSTA.....	44
4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	44
4.1.2 Análise por Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV-VIS)	44

4.1.3 Análise Termogravimétrica e Gravimetria Derivada TG/dTG	44
4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	45
4.1.5 Cinzas.....	45
4.1.6 Fluorescência de Raios-X (FRX)	45
4.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Dispersão em Energia acoplada (MEV-EDS).....	45
4.1.8 Análise do teor de pigmentos do material extraído.	46
4.2 DE ACORDO COM A NORMA UTILIZADA PARA COMPARAÇÃO	46
4.2.1 Análise por Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV-VIS)	46
4.2.2 Análise do teor de pigmentos do material extraído	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	49
5.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS).....	52
5.3 ANÁLISE do UV-VIS (ULTRAVIOLETA-VISÍVEL) DOS MATERIAIS EXTRAÍDOS DE ACORDO COM O PADRÃO DE REFERÊNCIA	57
5.3.1 Extratos líquidos	57
5.3.2 Extratos sólidos	59
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EXPRESSOS EM BIXINA POR ESPECTROFOTOMETRIA	62
5.4.1 Análise do teor de pigmentos dos materiais extraídos na extração proposta	62
5.4.2 Análise do teor de pigmentos do material extraído segundo a norma. 64	
5.5 ANALISE TERMOGRAVIMETRICA DAS AMOSTRAS (TG e dTG)	64
5.6 ANALISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) ...	67
5.8 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (FRX).....	70
5.7 CINZAS	71
5.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS).....	73
6 CONCLUSÃO	76
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem se consolidado como o maior produtor de sementes e corantes a base de urucum (*Bixa orellana* L.) (COLOSIMO *et al.*, 2022). O país ocupa destaque, tanto pela quantidade quanto pela qualidade, disponibilizando no mercado, sementes com até 6% de bixina, o carotenoide majoritário presente no grão usado pela indústria. Segundo o IBGE, a produção de urucum no Brasil, em 2021 alcançou um total de 12.252 toneladas de sementes. Mesmo a produção tendo aumento nas últimas décadas, o preço do quilograma da semente de urucum, vêm aumentando ao longo dos últimos, muito provavelmente devido ao aumento da demanda desse produto no mercado.

Os compostos bioativos presentes nas sementes de urucum são conhecidas principalmente por seu alto poder de ação pigmentar, devido à presença principalmente do carotenoide bixina (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018; VARDANEGA *et al.*, 2019). Esse pigmento, não apresenta toxicidade, efeitos genotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e clastogênicos, além de ser excelente antioxidante, possui também ação bactericida (AGNER *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019a; GARCIA, S. V *et al.*, 2023 GASPARIN *et al.*, 2021; MONTE *et al.*, 2016;). Dessa forma, os extratos das sementes são amplamente utilizados pela indústria, como corante natural para alimentos, pela indústria de cosmética e para fins medicinais (COLOSIMO *et al.*, 2022; STRINGHETA *et al.*, 2018; VARDANEGA *et al.*, 2019).

Além da bixina, a semente de urucum ganha destaque industrial e econômico por conter em seu arilo uma fração lipídica rica em tocotrienóis e geranilgeraniol. Os tocotrienóis pertencem ao grupo das vitaminas lipossolúveis é um dos componentes da Vitamina E já o geranilgeraniol é um diterpeno (metabólito secundário) destacando-se por desempenhar várias atividades biológicas e funcionando como um intermediário na biossíntese das Vitaminas E e K. Ambos podem ser utilizados como suplemento nutricional, em alimentos e bebidas (FABRI, GOMES; ROBERTO; CARVALHO, 2012; HO *et al.*, 2018; JAŚKIEWICZ *et al.*, 2019; MORAES; ZABOT; MEIRELES, 2015).

Os consumidores vêm buscando cada vez mais por produtos de origem natural, pois já existe uma preocupação com a sua saúde, além do que, vários países terem proibido o uso de corantes sintéticos em alimentos (HUSA; HAMZAH;

SAID, 2PACHECO *et al.*, 2019). Logo, a aplicação de corantes naturais tem se intensificado nas indústrias alimentícias e, portanto, o desenvolvimento tecnológico de processamento deve acompanhar a evolução do mercado.

Com relação aos processos tecnológicos de processamento do urucum três métodos comerciais básicos de extração se destacam: a extração alcalina, a extração em óleo e a extração com solventes orgânicos. Devido aos interesses na separação de substâncias farmacologicamente ativas que compõe as sementes de urucum, o desenvolvimento tecnológico, dessa indústria, tem ganhado notoriedade podendo alcançar um novo patamar. Nesse sentido, várias técnicas de extração estão sendo estudadas, dentre as quais, a extração assistida por ultrassom ou micro ondas, a extração com fluido supercrítico e a extração acelerada por solventes (COLOSIMO *et al.*, 2022; IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; KANG *et al.*, 2010)

Algumas impurezas presentes no extrato podem afetar a qualidade e estabilidade do corante e substâncias ativas presentes, tais como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, amido e outras moléculas solúveis, devido aos métodos não seletivos de extração (COLOSIMO *et al.*, 2022; ZABOT *et al.*, 2019). Nesse sentido, um método de extração e isolamento dos compostos é fundamental para aumentar a atividade biológica dos componentes extraídos bem como o seu rendimento.

Dentre os vários métodos de extração de compostos bioativos, aquele que utiliza solventes orgânicos é o mais eficiente do ponto de vista do teor de pigmentos extraídos e da pureza do extrato (ALCÁZAR-ALAY *et al.*, 2017; IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). Vários solventes têm sido usados para extração e quantificação de compostos do urucum, mas nenhum estudo sistemático de interações composto-solvente e seu impacto na extração e quantificação com diferentes solventes polares e apolares foi relatado.

Como o uso de solventes foi proposto por ser um processo alternativo mais rápido, barato e seguro, (AGUDELO PATIÑO *et al.*, 2023; IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018), buscou-se um produto extraído com finalidade industrial, comercial e laboratorial. Nessa pesquisa, desenvolveu-se uma nova rota de extração de compostos bioativos com solventes polares e apolares de compostos bioativos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Desenvolver uma nova rota de extração de compostos bioativos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) com solventes polares e apolares.

1.1.2 Específicos

- Extrair os compostos bioativos das sementes do urucum utilizando diferentes solventes;
- Analisar o rendimento dos compostos extraídos;
- Caracterizar a estrutura e a morfologia dos compostos bioativos extraídos;
- Avaliar os teores de bixina extraídos a partir da rota de extração proposta;
- Avaliar os teores de minerais das cinzas das sementes de urucum;
- Caracterizar estruturalmente as sementes de urucum.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO URUCUM

A *Bixa orellana* L., chamada assim pelo conquistador Francisco de Orellan (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; TAY-AGBOZO, 2018), popularmente conhecida como “urucum” e “colorau” (no Brasil), “achiote” (no México) e “annatto” (nos EUA) (DE OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019a). É um arbusto característico da floresta amazônica e várzea (Figura 1 a), as sementes (Figura 1 b) produzem um pigmento de coloração avermelhada, daí o nome urucum, palavra derivada do Tupi-Guarani *uru-ku* que significa “vermelho”, podendo variar de tonalidades a depender da sua concentração em solução (NOBRE *et al.*, 2006).

Figura 1 - O urucuzeiro (a) e sementes de urucum (b).

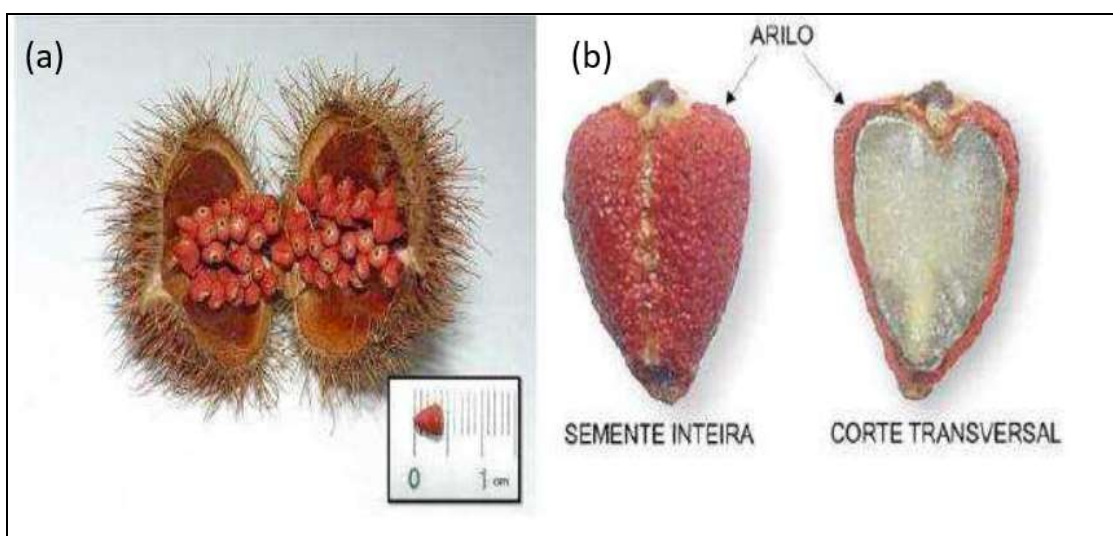


Fonte: Tay-Agbozo (2018).

O urucuzeiro é originário da América tropical, pertencente à família Bixaceae (KARMAKAR *et al.*, 2018). A planta exibe grande variabilidade de coloração, com caule pardo-avermelhado, flores brancas ou rosas, frutos (cachopas) e sementes vermelhos-escuros (LLOYD, 1980; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018), estes usados como ingredientes alimentícios há muito tempo (VAN CHUYEN; HOI; EUN, 2012), um corante que existe nas formas hidrossolúvel e lipossolúvel, podendo ser empregado em vários produtos alimentícios (AGNER *et al.*, 2004).

As sementes são consideradas a parte da planta com importância comercial, já que o pericarpo seco da semente (revestimento externo da semente) possui pigmentos com grande aplicação industrial. A partir delas é produzido um dos corantes mais usados no mundo, que é utilizado não somente em produtos alimentícios, mas também nas indústrias química, cosmética e farmacêutica (VARDANEGA *et al.*, 2019; VILAR *et al.*, 2014). Possui baixos custo de produção e toxicidade o que o torna um pigmento atrativo e conveniente em substituição a corantes sintéticos (AGNER *et al.*, 2004). Dentre os corantes naturais, o urucum tem grande importância econômica-social, já que de suas sementes consegue-se obter corantes que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho. Quando comparado aos demais pigmentos naturais, o urucum possui maior estabilidade e uma coloração atrativa (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

Figura 2 - Cachopa de urucum (a) Semente inteira e em corte (b)



Fonte: Carvalho *et al.*, (2010)

As sementes de urucum possuem um pericarpo (arilo) (Figura 2) que apresenta várias substâncias além do característico pigmento vermelho, este representa de 5 a 10% do peso da semente, dos quais 30% do peso total é representado pelos carotenoides. Os 70% restantes estão divididos entre proteínas, lipídeos, carboidratos, umidade e cinzas (Tabela 1) (CARVALHO, PAULO ROBERTO NOGUEIRA *et al.*, 2010), além de ser uma rica fonte de compostos de interesse em diversas áreas (ZABOT *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Composição das sementes de Urucum.

Composição (%)	Semente ⁽¹⁾	Arilo
Umidade	9,8	3,5
Cinzas	4,6	2,0
Proteína bruta (%N x 6,25)	10,8	2,5
Extrato etéreo	4,8	30
Carboidratos totais	70	32
Carotenoides totais	-	30

Fonte: Carvalho *et al.*, (2010).

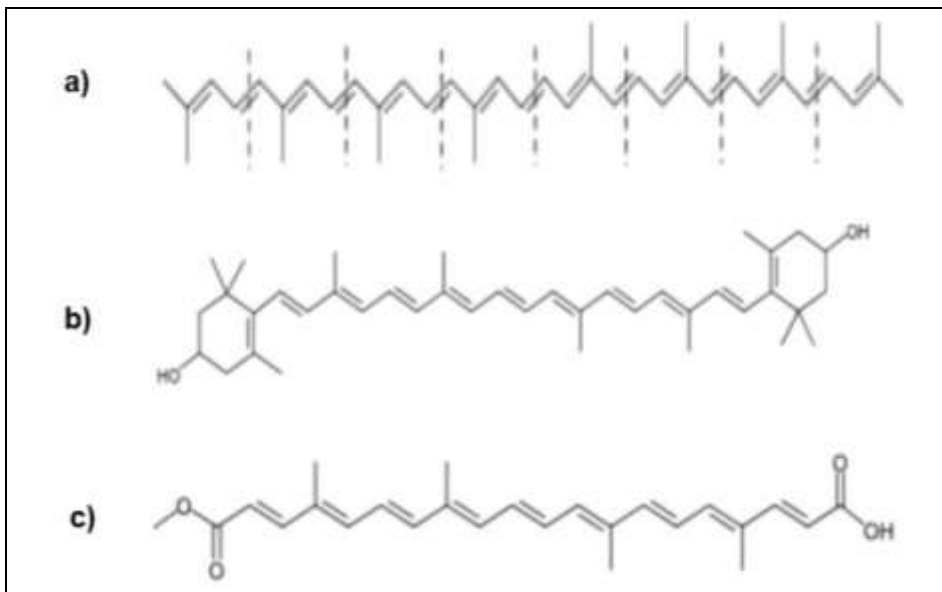
2.2 CAROTENOIDES

A palavra carotenoide é derivada de cenoura (*Daucus carota*) por conter os principais pigmentos da sua raiz (RODRIGUEZ-CONCEPCION; STANGE, 2013).

Biologicamente os carotenoides são sintetizados por todos os foto autotróficos terrestres e aquáticos, incluindo plantas, microalgas e macroalgas, apresentam pigmentações vermelhos, amarelos e laranjas (SAINI *et al.*, 2022). Bioquimicamente os carotenóides são sintetizados através da adição gradual de três unidades de isopentenil pirofosfato (IPP) a um dimetilalil difosfato (DMAPP) para formar o precursor de 20 carbonos geranilgeranil difosfato (GGPP) (BURRI, 2012; SAINI *et al.*, 2022; WALTER; STRACK, 2011)

Os carotenóides são hidrocarbonetos naturais (carotenos) contendo oito unidades de isopreno [$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$] (ou seja, tetraterpenos), derivados do licopeno ($\Psi\Psi$ -caroteno) (Figura 3 a), alguns carotenóides apresentam grupos cíclicos terminais com nove carbonos, como o β -caroteno. Possuem grupos oxigenados como hidroxila ou epóxido denominados xantofilas, como a luteína (Figura 3 b). Esses carotenóides com menos de quarenta átomos de carbono são conhecidos como apocarotenóides, como por exemplo a bixina (Figura 3 c), um éster monometílico e principal corante do urucum. (SHUMSKAYA; WURTZEL, 2013; VERSHININ, 1999; VILAR *et al.*, 2014; WALTER; STRACK, 2011).

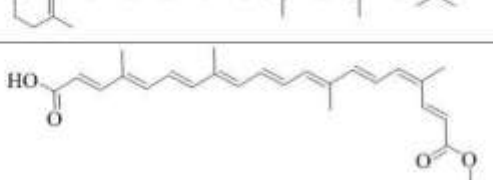
Figura 3 - Fórmulas estruturais do Licopeno (a), Luteína (b) e Bixina (c)



Fonte: Adaptado de VILAR (2014).

Na isomeria, as ligações duplas na cadeia de polieno dos carotenóides produzem diversos isômeros geométricos e ópticos. Esta cadeia entre 9 e 11 ligações duplas, promove a absorção de luz visível na faixa de comprimento de onda de 400-500 nm e é a fonte do vermelho, amarelo, laranja, etc. cores geralmente associadas a carotenóides (Figura 4).(SAINI *et al.*, 2022; SIEFERMANN-HARMS, 1985; VERSHININ, 1999). No primeiro tipo de estereoisomerismo, as moléculas podem apresentar os isômeros *all-trans* (all-E) ou *cis* (Z) e consequentemente, muitos tamanhos e formas (LU; LI, 2008; SHUMSKAYA; WURTZEL, 2013).

Figura 4 - Comprimento da conjugação e cor de alguns carotenoides.

Carotenoid	Structure	Conjugation	Color
Phytoene		3	Colorless
Phytofluene		5	Colorless
ζ-carotene		7	Yellow
Neurosporene		9	Orange
Bixin		9	Purple
Lycopene		11	Red

Fonte: Adaptado de Lu & Li (2008).

As propriedades químicas, bioquímicas e biológica dos carotenoides são essenciais para o corpo humano pois preservam suas células contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres e pelas espécies reativas de oxigênio que podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e atacar proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (SHAMI; MOREIRA, 2004).

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO URUCUM E SUAS APLICAÇÕES

Como o urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta, a sua fitoquímica é dependente da vegetação a qual ela nasce e como consequência a composição dos constituintes que formam suas sementes variam de região para região. Existe uma grande variedade de *Bixa orellana* L. e com ela muitos fitoquímicos, como corantes amarelos, bixina e norbixina, mono e diterpenos, além de compostos fenólicos (COELHO DOS SANTOS *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2019; SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). As sementes possuem também uma quantidade substancial de compostos carotenóides, principalmente carotenóides (9'-cis-

norbixina e all-trans-norbixina) e outras criptoxantinas menos importantes, luteína, zeaxantina metilbixina e geranilgeraniol (GALINDO-CUSPINERA; RANKIN, 2005), além da fração lipídica formada pelos tocotrienóis (COSTA, C. K. *et al.*, 2013)

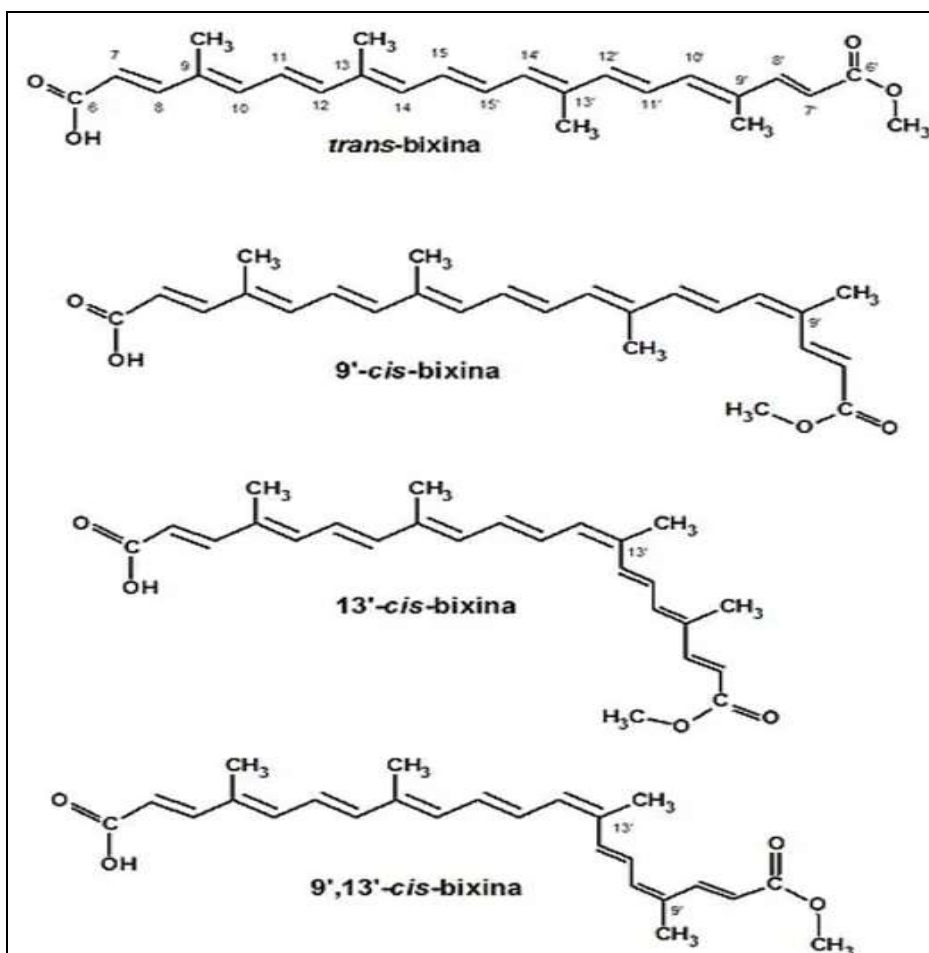
2.3.1 Bixina

A bixina é um pigmento natural vermelho-alaranjado, tipicamente ela é biossintetizado pela clivagem enzimática do licopeno. (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018). Cerca de 80% desse pigmento é o carotenoide bixina, encontrado na superfície da semente tendo propriedade corante (VILAR *et al.*, 2014). De acordo com a variedade da planta, a localização geográfica da cultura, a altitude da área explorada e as condições climáticas, a quantidade de bixina nas sementes pode variar (COELHO DOS SANTOS *et al.*, 2022; VILAR *et al.*, 2014).

As propriedades estruturais e físico-químicas da bixina (α -bixina), revelam que ela é um éster apocarotenóide com fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ e massa molar 394,51 g/mol. (RAHMALIA *et al.*, 2014; RIVERA-MADRID *et al.*, 2016).

Naturalmente encontra-se na configuração cis-estéreoquímica, mas apresenta três isômeros principais de trans-bixina, 9',13' -di-cis-bixina e 9' -cis-bixina, contendo nove ligações duplas de carbono conjugado (Figura 5) (SCOTTER, M. J. *et al.*, 1994; SCOTTER, MICHAEL J., 1995). Sua isomerização é causada devido a deslocalização e transição dos elétrons π ao longo do esqueleto do polieno (RIOS; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns isômeros da Bixina



Fonte: Adaptado de Scotter (1994).

As duplas ligações da bixina podem isomerizar durante o isolamento e solubilidade ou quando expostas ao calor e à luz, quando isso ocorre podem converter-se em vários isômeros como a β -bixina, sua configuração *all-trans* e o pigmento de *McKeown*, um composto amarelo de 17 carbonos (SCOTTER, MICHAEL J., 1995).

A análise espectrofotométrica de todo espectro visível nos fornece informações importantes a respeito dos compostos extraídos das sementes do urucum. Em espectrofotometria UV-Visível, os carotenóides normalmente mostram três picos de absorção máxima. Este apocarotenóide é um liner insaturado de ácido carotenóico, um monoéster de ácido dicarboxílico e um éster metílico com 9 ligações duplas conjugadas de absorbância específica ($\lambda_{\max}$) em 430, 461 e 490 nm (DE OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019a; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

Durante os processos de isolamento e preparação, a bixina pode se degradar, como extração ou secagem por pulverização de suas fontes via oxidante, pHs altos, oxigênio e condições térmicas. (RAHMALIA *et al.*, 2018; SCOTTER, MICHAEL J., 1995).

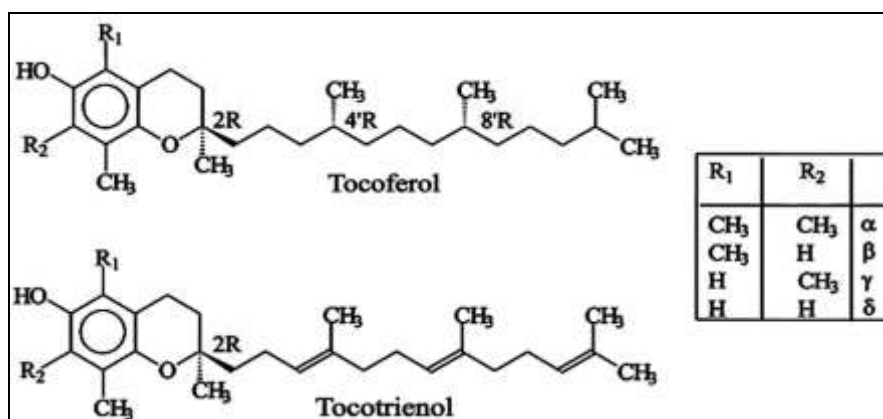
2.3.2 Tocotrienóis e Tocoferóis

São substâncias conhecidas pelo seu poder antioxidante presente nas espécies vegetais além de serem compostos conhecidos por inibir processos de oxidação de lipídios em alimentos e sistemas biológicos. (COSTA, C. K. *et al.*, 2013; MOHAMAD; IMA-NIRWANA; CHIN, 2021)

Recentemente foi identificado como um vegetal rico em δ -tocotrienóis, uma fração lipídica presente na porção externa da semente (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012; CHAO *et al.*, 1991; MORAES; ZABOT; MEIRELES, 2015), superando substâncias como o óleo de palma e o farelo de arroz, o urucum (*Bixa orellana* L.).

Nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis, são conhecidos pelo nome genérico “vitamina E”, utilizado para designar oito diferentes compostos, são moléculas hidrofóbicas com baixa solubilidade em água, o que leva ao desenvolvimento de estudos sobre emulsificação (ZABOT; MORAES; MEIRELES, 2018). Os tocoferóis e os tocotrienóis, possuem um anel cromanol onde as estruturas se diferenciam dependendo do número e da localização dos grupos substituintes destes anéis, eles ocorrem em uma variedade de isômeros (Figura 6) (BAPTISTÃO, 2020; GUINAZ *et al.*, 2009).

Figura 6 - Estrutura química dos tocotrienóis e tocoferóis respectivamente.



Fonte: Adaptado de Guinaz (2009).

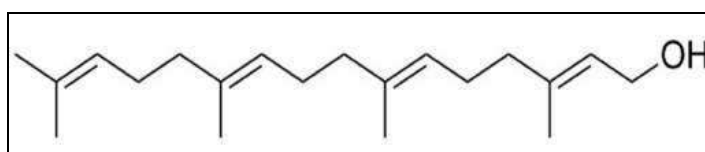
Sendo substâncias importantes nos alimentos, os tocoferóis por possuírem propriedades de vitamina E, apresentam atividades antioxidantes, o que faz com que eles protejam os tecidos do corpo contra os efeitos maléficos dos radicais livres. Entre todos os homólogos do tocoferol, o δ -tocoferol apresenta o maior potencial biológico (HOUNSOME *et al.*, 2008; LÓPEZ ORTÍZ; PRATS MOYA; BERENGUER NAVARRO, 2006). A ação antioxidante acontece pelo fato da sua capacidade em doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, e com isso impedir a oxidação dos lipídeos (COSTA, C. K. *et al.*, 2013).

A principal função do δ -tocoferol é a de radical antioxidante em cadeias de membranas e lipoproteínas, bem como em alimentos (COSTA, PAULO AFONSO DA *et al.*, 2010; SCHWARTZ *et al.*, 2008). Toda eficácia dos extratos de urucum na prevenção da peroxidação de lipídios e como agente antioxidante, é promovida pela combinação da ação dos tocoferóis com a bixina (CHISTÉ; MERCADANTE; *et al.*, 2011; KIOKIAS; GORDON, 2003; MIYAZAWA; NAKAGAWA; SOOKWONG, 2011).

2.3.3 Geranilgeraniol

O principal constituinte terpênico das sementes de urucum, o geranilgeraniol é um isoprenóide encontrado na via intermediário da biossíntese das vitaminas E e K, bem como um importante derivado metabólico na via de síntese de isoprenóides/colesterol (HO *et al.*, 2018). Os isoprenóides, também chamados de terpenóides, consistem em unidades de isopreno (C5) e são classificados com base no número de unidades de isopreno. Os principais grupos são monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e triterpenos (C30), (VARDANEGA *et al.*, 2019). Utilizado para descrever um álcool diterpeno de cadeia linear e ocorrência natural, o geranilgeraniol possui fórmula estrutural que pode ser descrita como: trans-3, 7, 11, 15-tetrametilhexadecatetra-2, 6, 10, 14-em-1-ol (Figura 7). (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

Figura 7 - Fórmula estrutural do Geranilgeraniol.



Fonte: Adaptado de Taham (2015).

2.3.4 Aplicações dos compostos bioativos da semente do urucum na indústria de Alimentos

O urucum é o único corante natural que tem sua origem no Brasil. Seu baixo custo de produção, aliado à baixa toxicidade, tornam o pigmento muito atrativo e conveniente à indústria de alimentos, propiciando substituição a muitos corantes de origem sintética (AGNER *et al.*, 2004; FABRI, ELIANE GOMES; TERAMOTO, 2015; HUSA; HAMZAH; SAID, 2018).

Aprovado tanto pela *Food and Drug Administration* (FDA) como corante e aditivo na indústria de alimentos (KAPOOR; RAMAMOORTHY, 2021; MA *et al.*, 2021; PACHECO *et al.*, 2019) quanto pela União Européia e em outros lugares do mundo, é amplamente utilizado como ingrediente seguro em muitos produtos alimentícios por sua atividade antioxidante e um amplo espectro de cores vermelho-alaranjado-amarelo (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018; PACHECO *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia, como corante natural, a bixina é utilizada em produtos lácteos, bebidas, doces, margarina, óleo de salada, sorvete, produtos à base de cereais, produtos extrusados, salsichas, arroz, sopas, molhos, bebidas, produtos à base de peixe, produtos à base de carne, doces, bolos, etc., na indústria de creme e queijo são os mais utilizados (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021).

Em 2018 Pacheco *et al.*, (2018) avaliou o efeito antioxidante do processamento de produtos cárneos reestruturados usando sal de potássio de bixina como substituto ao nitrito de sódio (NaNO_2), logo o sal produzido e analisado mostrou-se uma alternativa viável aos nitritos por preservar a cor e inibir a degradação oxidativa da carne reestruturada, também mostraram que o efeito do sal de bixina e potássio na estabilização microbiológica foi bastante variável, dependendo da espécie bacteriana considerada.

2.3.5 Aplicações dos compostos bioativos na Saúde

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram o uso tradicional da bixina como agente terapêutico por suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias com capacidade geral para controlar doenças, como por exemplo, dor, síndromes infecciosas, cardiovasculares, cancerígenas, neurodegenerativas e metabólicas, demonstrando que o carotenoide exerce a ação farmacológica no organismo (LAKEY-BEITIA *et al.*,

2019; MA *et al.*, 2021; PACHECO *et al.*, 2019). Também se investigou os mecanismos da bixina sendo induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos na inflamação renal, fibrose e estresse oxidativo. Os resultados do estudo mostraram que a Bixina melhorou o dano renal diminuindo os níveis séricos de creatinina, uréia, ácido úrico e aliviando a fibrose renal (MA *et al.*, 2021)

O efeito da bixina sobre a alodinia mecânica, comportamentos depressivos e ansiosos associados ao diabetes, juntamente com seus mecanismos envolvidos, nesse estudo foi concluído que a bixina pode representar uma alternativa para o tratamento de comorbidades associadas ao diabetes, neutralizando o estresse oxidativo e a HbA1 plasmática (GASPARIN *et al.*, 2021).

Ensaio *in vitro* mostraram também que a bixina restaurou a sensibilidade das células de melanoma A2058 à dacarbazina (agente anticâncer clinicamente utilizado para a terapia de melanoma metastático) e aumentou sua atividade anti-migratória. Diferentes experimentos também indicaram que esse apocarotenóide potencializou o efeito pró-apoptótico da dacarbazina por aumentar o estresse oxidativo, logo esses dados sugerem que a bixina exerce atividade antimelanoma intrínseca por mecanismos complementares aos da dacarbazina, incentivando seu uso em terapia combinada para o tratamento do melanoma cutâneo (DE OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019).

Por possuírem propriedades antioxidantes, os carotenoides desempenham papel de fotoproteção. Foi demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro* e está relacionado com sua atividade antioxidante ou com a modulação de outros antioxidantes celulares. (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2010). A alta reatividade química e suas ligações duplas conjugadas é o que lhes concede propriedades antioxidantes (BHATT; PATEL, 2020).

A norbixina (composto bioativo das sementes do urucum) demonstrou ser uma substância capaz de potencializar o efeito fotoprotetor dos filtros sintéticos além de ser um excelente antioxidante. O uso da norbixina, em produtos fotoprotetores, acompanha a tendência no mundo dos cosméticos, pois o uso de produtos naturais favorece o aumento da fotoproteção e confere ação antioxidante as formulações (GARCIA, S. V *et al.*, 2023)

O corpo humano apresenta defesas biológicas de proteção com o intuito de retardar os efeitos cumulativos da radiação UVA e UVB: os antioxidantes enzimáticos (glutathione, peroxidase, catalase, metionina-redutase e

superóxidodismutase) e os não enzimáticos (vitaminas, minerais, cofatores e polifenóis) (FRANÇA *et al.*, 2013).

Os antioxidantes são substâncias que tem a capacidade de inibir o processo de oxidação de substratos oxidáveis. Dentro da perspectiva biológica, são compostos que protegem o organismo humano, contra os efeitos nocivos provocados pelos radicais livres (VANNUCCHI; MARCHINI, 2014). Muitas substâncias antioxidantes já foram identificadas nas plantas (PEREIRA, ANA LÚCIA FERNANDES; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Com relação aos tocoferóis e tocotrienóis, as principais aplicações desses compostos do urucum incluem o tratamento de doenças cardiovasculares e câncer (HOUNSOME *et al.*, 2008) e prevenção da peroxidação lipídica (CHISTÉ; MERCADANTE; *et al.*, 2011) os tocotrienóis combinados com a bixina atuam sinergicamente para proteger os lipídios insaturados da oxidação (CASTRO; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2011).

Um estudo publicado por Sun *et al.*, (2012) sobre a ação da vitamina E em testes com ratos, mostrou uma redução significativa nos compostos oxidativos causado pela eliminação dos radicais livres, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica. Esse mesmo autor demonstrou em outro estudo que a suplementação com Vitamina E na alimentação de pessoas saudáveis mostrou redução no estresse oxidativo de células sanguíneas. Também foi demonstrado que a ação dos tocotrienóis apresentaram propriedades anticâncer (PIERPAOLI *et al.*, 2013; RAHMAN *et al.*, 2008) e na prevenção de doenças cardíacas (LEE *et al.*, 2005; SHIBATA *et al.*, 2008).

O geranilgeraniol é o principal constituinte terpênico das sementes de urucum e apresenta diversas propriedades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória (GIRIWONO *et al.*, 2013; PEREIRA, WANDERSON S. *et al.*, 2018) regulação da produção de testosterona (HO *et al.*, 2018) ação contra a doença de Chagas (MENNA-BARRETO *et al.*, 2008) e leishmaniose (DA SILVA SANTOS *et al.*, 2016) e atividade anticancerígena (KATURU *et al.*, 2011).

Em 2018 Jaśkiewicz *et al.*, (2019) realizou um estudo sobre a ação diversa das estatinas selecionadas no músculo esquelético onde ela tentou explicar o efeito protetor do Geranilgeraniol em Estatina-Associado selecionadas no músculo esquelético Miopatia (SAM), nessa pesquisa, constatou-se que o geranilgeraniol

previne o SAM, em parte, como consequência de uma via independente da caspase-3, provavelmente pela inativação do sistema calpaína.

2.3.6 Aplicações compostos bioativos diversas na indústria

Além da vasta utilização dos compostos extraídos das sementes de urucum em inúmeras aplicações na indústria alimentícia e da saúde, há ainda uma enorme outra parcela de aplicações em setores têxtil e de couro, cosméticos etc. (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016).

Um material composto por acetato de celulose (nanofibra) associado ao extrato bruto de urucum foi testado *in vivo* onde teve êxito na cicatrização de feridas, demonstrando ser um material inédito com boa compatibilidade (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

A bixina foi explorada como um corante sensibilizador em células solares e na terapia fotodinâmica. E em Células solares baseadas em nanopartículas de TiO_2 foram sensibilizadas usando corantes naturais bixina e norbixina e seu desempenho foi analisado na presença e ausência de aditivo 2,2'-bipiridina (bipy) no eletrólito. Os resultados demonstraram que o aditivo, 2'-bipiridina (bipy) promoveu o aumento significativo na voltagem das células. Este efeito foi mais pronunciado para a célula sensibilizada com bixina, pois seu potencial aumentou de 299 para 519 mV (CARVALHO, I. C. *et al.*, 2020; CELLS *et al.*, 2015; RAHMALIA *et al.*, 2018; TAY-AGBOZO, 2018; TAYA *et al.*, 2015; TRACTZ *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado por Alwis *et al.*, (2021) dois apocarotenoides, bixina e norbixina sofrem fotodegradação na superfície de nanopartículas semicondutoras de TiO_2 . Logo, foi sugerido que o semicondutor TiO_2 pode atuar como um catalisador para o processo de fotodegradação com um mecanismo comum à formação do cátion do radical apocarotenoide.

Stooll *et al.*, (2023) adicionou bixina em filmes de PLA (poli(láctido)) após mistura por fusão ou fundição de solução para obter novos materiais de embalagem para produtos alimentícios sensíveis à luz, nesse sentido, a bixina mostrou-se um aditivo natural muito promissor para melhora do desempenho de materiais de embalagem comercial para preservar a qualidade de diversos produtos alimentícios sensíveis à oxidação.

A bixina foi testada formando um filme fino como um biosorvente para a remoção de íons mercúrio (Hg^{2+}) em soluções aquosas, os resultados mostraram que o filme de bixina é uma alternativa adequada para a remoção eficiente de mercúrio (Hg^{2+}) de diversos sistemas aquosos. Isso introduz uma nova classe de biosorvente baseada em apocarotenóides, que são sustentáveis, de baixo custo, não tóxicos e facilmente obtidos (CONDÉ VIEIRA *et al.*, 2021).

Atualmente, a procura por compostos bioativos tem crescido, principalmente aqueles que apresentam atividade antioxidante, devido a capacidade que eles têm em interagir com as espécies reativas de oxigênio e impedir que ocorra efeitos biológicos indesejados nas proteínas, DNA e RNA, bem como alterações oxidativas de aminoácidos, peroxidação lipídica e ligações cruzadas com outras macromoléculas, ruptura de cadeias e rearranjos cromossômicos, clivagem peptídica e mutações (MELOI *et al.*, 2011).

Antioxidantes naturais, tais como as vitaminas, polifenóis e os carotenoides, têm sido utilizados na área dos cosméticos, como por exemplo, em formulações de fotoprotetores por causa das suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes. Dentre os antioxidantes mais conhecidos e usados nas formulações fotoprotetoras estão a Vitamina E, vitamina C e o betacaroteno que já tiveram seus efeitos fotoprotetores comprovados (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

2.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DO URUCUM

A extração de compostos das sementes de urucum, foi aprendida com os índios, de maneira artesanal misturavam as sementes em água quente com a finalidade de extrair a calda vermelha. Em referência a uma especiaria portuguesa homônima de coloração igual, o corante passou a ser chamado de colorau, dessa forma nascia naquela época o colorau ou colorífico, nome utilizado até hoje (FABRI, GOMES; ROBERTO; CARVALHO, 2012; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

Pelo fato dos seus pigmentos estarem localizados na porção externa (pericarpo) das sementes, para extração não é necessária a sua maceração. Numerosas abordagens são usadas para extrair os pigmentos das sementes de urucum secas, normalmente são extraídos por processos mecânicos (Atrito e secagem em leito de jorro; Raspagem e peneiramento) ou físico-químicos (Extração

com óleos vegetais; Extração com solventes orgânicos; Extração com solução alcalina e Extração com CO₂ supercrítico) (SINHA *et al.*, 2013; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015; TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016; YOLMEH; HABIBI NAJAFI; FARHOOSH, 2014).

Três métodos básicos, de maneira comercial, são mais usados para extrair o pigmento das sementes: a extração alcalina; a extração em óleo, que resulta na remoção da bixina das sementes, além de pequenas quantidades de outros materiais coloridos; e a extração com solvente, que resulta na forma mais pura do pigmento bixina. De forma alternativa a extração mecânica, a extração com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico também podem ser utilizadas. Estes dois últimos são caracterizados por serem métodos de extração não poluentes, embora ainda sejam mais utilizados em escalas laboratoriais como objetos de estudo (COLOSIMO *et al.*, 2022; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015; TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016).

2.4.1 Atrito e secagem em leito de jorro

É um processo mecânico, desenvolvido por Marthur e Gishler em 1955. O leito de jorro é um equipamento que promove o contato sólido-fluido. Nesse equipamento as sementes de urucum são forçadas por uma corrente de ar através de um tubo em um extrator de leito de jorro. A principal característica deste equipamento é o movimento circular e uniforme das partículas no interior do leito, o que proporciona um bom contato entre o fluido e as partículas, garantindo elevados coeficientes de transferência de calor e massa justificando, assim, o seu uso em secagem e inoculação de grãos (IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018)

Barrozo *et al.*, (2013) em seu trabalho, demonstrou ser possível de forma eficiente extrair bixina utilizando esse aparelho. Taham *et al.*, (2016) propuseram o uso de uma nova configuração para o leito de jorro utilizando um tubo draft, ou seja, um anteparo com altura regulável objetivando aumentar o rendimento da extração.

2.4.2 Raspagem e peneiramento

Esses métodos de extração não são utilizados industrialmente pois são métodos grosseiros que não garantem um bom rendimento. Como o material

desejado se encontra no pericarpo (porção externa) da semente, a raspagem pode ser feita com escovas de náilon, sob a sua superfície. O peneiramento é realizado através da agitação das sementes em uma peneira, de forma que a camada externa se desprenda e seja separada originando uma “massa” corante (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

2.4.3 Extração com óleos vegetais

Uma maneira industrial de extração direta, simulando o que ocorre na culinária tradicional da América Latina, a semente de urucum é imersa em óleo vegetal comestível refinado, para produzir uma solução oleosa de bixina, que é então aquecida e filtrada. Esse filtrado é vendido como corante com um alto teor de lipídios para temperar alimentos (IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

O extrato normalmente possui uma quantidade próxima de 1,5% de bixina, ou uma suspensão de aspecto oleoso com até 8% de bixina sendo vendidas diretamente como corante de urucum, um óleo-solúvel após a padronização da cor característica (COLOSIMO *et al.*, 2022; IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010). A bixina é o principal componente obtido neste método de extração, embora existam compostos que se originam da degradação térmica, estes possuem uma coloração amarelada são mais estáveis devido a utilização do calor, inerente do processo da extração, além de serem lipossolúveis (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

Como a extração da 9'-*cis*-bixina pode acontecer pelo aquecimento da suspensão das sementes a uma temperatura máxima de 130 °C, ocorre a isomerização da forma *cis* em seus isômeros *trans*, 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 (LLOYD, 1980).

O colorau, colorífico ou corante pode ser produzido por este método de extração. Sua produção ocorre pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com o urucum em pó ou com o extrato oleoso de urucum. O produto, tem como principal

mercado a região Nordeste do país, é muito utilizado para proporcionar a cor avermelhada para carnes, molhos, queijos e arroz (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001)

2.4.4 Extração com solventes

Os fatores que afetam a taxa de extração dos pigmentos do urucum são tamanho da partícula, o solvente utilizado e a temperatura. Partículas menores, com grande área de superfície, podem ser lixiviadas em partículas maiores nesse caso, o solvente tem menos contato com a superfície a ser extraída. O solvente deve apresentar baixa viscosidade e circular livremente no sistema. Com relação a temperatura, geralmente a extração ocorre de maneira mais eficaz quanto maior for a temperatura de trabalho, porém a bixina é termossensível a temperatura acima de 100°C, logo o solvente deverá se misturar com a semente para uma maior extração dos compostos (IBRAHIM SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

A extração com solventes é a mais eficiente em relação ao teor de pigmentos extraídos e à pureza do extrato, porém é limitada pela necessidade de um solvente que seja compatível com o emprego do produto final. Para ensaios laboratoriais como a determinação do teor de bixina em sementes e extratos isolados de bixina dentre outros, os solventes orgânicos são os mais adequados (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

Os solventes apolares e polares se dividem em dois grupos: polares próticos (solvente que carrega uma ligação de hidrogênio) e polares apróticos (solvente que não carrega ligação de hidrogênio). A polaridade do solvente é fundamental tanto na extração quanto na caracterização de compostos orgânicos, haja vista que essa característica do solvente exibe comportamentos diferentes dos compostos extraídos (RAHMALIA *et al*(2014).

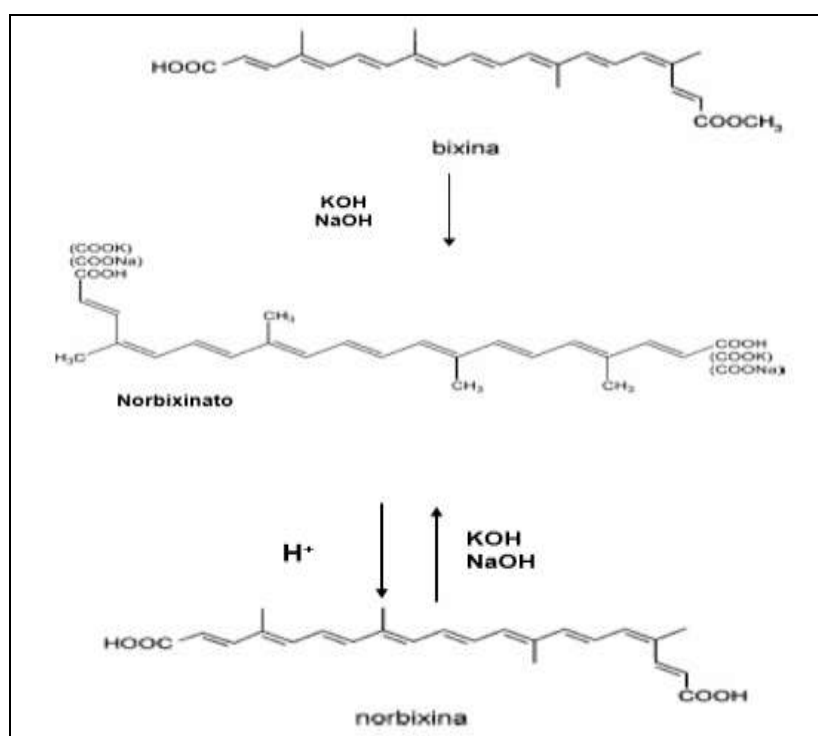
2.4.5 Extração com soluções alcalinas

O processo de extração de compostos que envolve soluções alcalinas é o mais utilizado de ponto de vista comercial, por ser o mais simples. A bixina não é solúvel em água, a não ser em solução alcalina, pode sofrer uma reação química de

saponificação. Utiliza-se três bases no processo, sendo elas o hidróxido de sódio (NaOH), potássio (KOH), amônio (NH₄OH) além do sal carbonato de sódio (Na₂CO₃) como fonte de álcali (VAN CHUYEN; HOI; EUN, 2012).

Colosimo *et al.*, (2022) mostram que a força da reação química de saponificação da bixina é dependente primordialmente da concentração e do tipo da base utilizada e, em última análise ao tempo e da temperatura do processo. Quanto maior for a concentração da base, a reação química de saponificação será mais completa. Algumas bases proporcionam reação completa enquanto outras oferecem uma reação parcial, gerando mistura de pigmentos (bixina e norbixina) no extrato (Figura 8).

Figura 8 - Reações químicas para obtenção do corante (norbixina) de urucum utilizando soluções alcalinas.



Fonte: Adaptado de Stringheta (2018).

Algumas dificuldades neste método de extração poderão surgir dependendo do meio, ser mais ou menos ácido. Na condição de um meio mais ácido, o norbixinato será reprotoneado e formará a norbixina, composto menos solúvel em água, nesse caso ocorre a precipitação do pigmento. Uma outra limitação associada ao método está na retirada da solução alcalina do extrato. Esta exige operações

unitárias posteriores ao processo, elevando o custo energético do processo (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

2.4.6 Extração com CO₂ supercrítico

A extração com fluido supercrítico (SFE - Supercritical Fluid Extraction) explora o poder de solvatação dos fluidos a temperatura e pressão acima de seus valores críticos (BRUNNER, 2005). Um dos fluidos supercríticos mais usados na indústria é o dióxido de carbono (CO₂), que possui temperatura crítica (T_c) de 31,1 °C e pressão crítica (P_c) de 73,7 bar. No processo de extração supercrítica, o CO₂ é utilizado como solvente em condições críticas de temperatura e pressão. Nestas condições, com alguns solventes, ocorre um aumento na solubilidade. Este método tem se mostrado vantajoso na remoção seletiva de compostos de sistemas alimentícios complexos (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

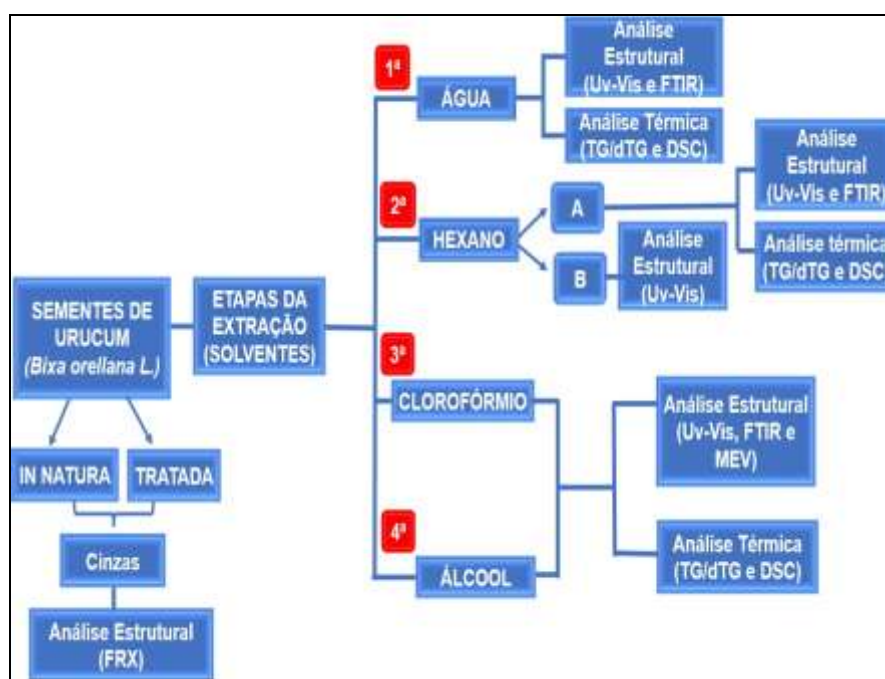
COLOSIMO *et al.*,(2022) em seu trabalho afirma que este método de extração de bixina é vantajoso pois não utiliza solventes tóxicos e produz produtos de alta qualidade além de se mostra um processo de baixo impacto ambiental.

3 METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Físico-Química (Instituto Federal do Piauí – IFPI) onde extraiu-se compostos bioativos das sementes de urucum, com diferentes solventes. As caracterizações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE-PE) e as caracterizações de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) no Instituto de Criminalística "Vital Araújo" Polícia Civil do Estado do Piauí (PC-PI).

Nessa pesquisa, foram executadas combinações de solventes, resultando na metodologia ilustrada no organograma da Figura 9. A fim de uma análise para demonstrar a viabilidade da metodologia proposta, realizou-se um estudo comparativo de acordo com o método apresentado por Husa (2018), com alterações, para a extração dos compostos bioativos das sementes de urucum.

Figura 9 – Fluxograma das Etapas experimentais realizadas na pesquisa.



Fonte: Autor (2023).

No Quadro 1 é apresentado as características dos materiais obtidos em cada etapa da extração e suas siglas.

Quadro 1 - Características dos materiais obtidos em cada etapa da extração e suas siglas.

Solvente Utilizado	Características do Material	Sigla
Água	Sólido de coloração preta	1
Hexano (P.A)	Líquido de coloração laranja	2A
	Líquido de coloração vermelha	2B
Clorofórmio (P.A)	Sólido obtido após a destilação	3A
	Sólido obtido do resíduo do balão volumétrico	3B
Álcool Etílico (P.A)	Sólido obtido antes da destilação	4A
	Sólido obtido após a destilação	4B

Fonte: Autor (2023).

3.1 QUÍMICA E REAGENTES

A matéria prima empregada foi a semente de urucum (*Bixa orellana L.*), obtida em comércio local da cidade de Teresina-Piauí, em novembro de 2022. A Tabela 2 apresenta os solventes utilizados, necessários para a realização da pesquisa.

Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados.

Solvente	Tipo	Fornecedor
Água destilada	P.A ACS	Própria do laboratório
Hexano	P.A ACS	Dinâmica
Clorofórmio	P.A ACS	Êxodo científica
Álcool Etílico	P.A ACS	Vetec

Fonte: Autor (2023).

3.2 ETAPAS DAS EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Inicialmente as sementes foram selecionadas de forma que visualmente apresentassem uma coloração laranja-avermelhada intenso. 200,0 g de sementes, previamente livres de impurezas, foram colocadas em um saco filtrador deixando-as em refluxo, por 24 horas, em um sistema Soxhlet. Utilizou-se 700,0 mL de cada solvente (Tabela 2), de maneira alternada por ordem de polaridade.

Na primeira etapa do processo, utilizou-se a água destilada, foi observado, a olho nu, que as sementes eram de cor avermelhada e a solução que escorria da corneta extratora do sistema Soxhlet durante o refluxo para o balão de fundo redondo era da mesma tonalidade.

Na segunda etapa do processo de extração após 20 minutos de secagem das sementes na capela, foi utilizado o Hexano (P.A), como solvente. Visualmente foi observado que as sementes prosseguiram com a mudança de coloração enquanto a extrato apresentou duas fases de colorações diferentes.

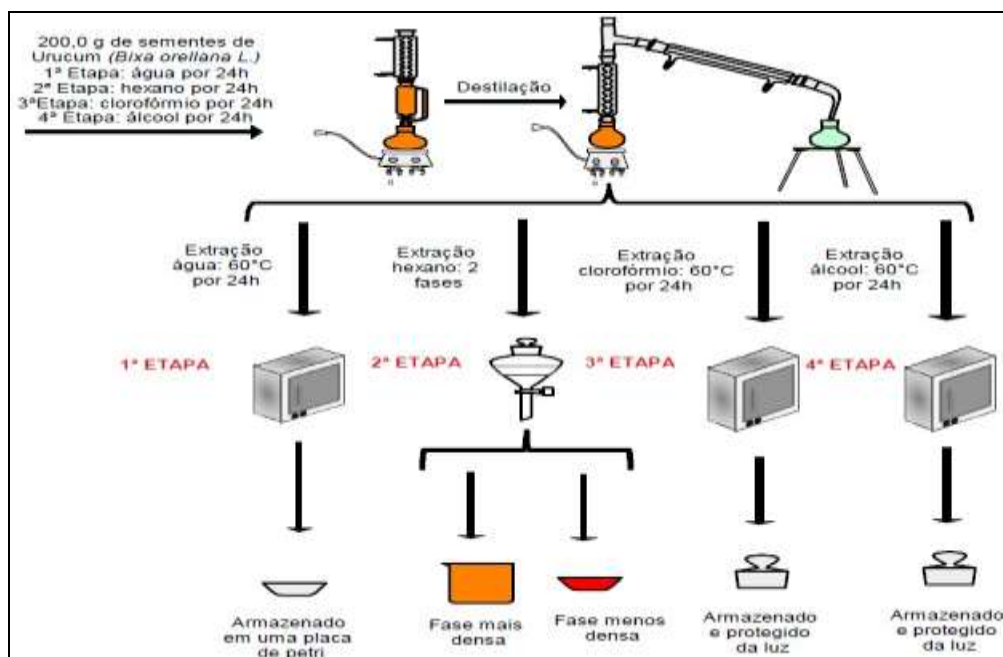
Na terceira etapa, após a secagem das sementes por mais 20 minutos na capela, usou-se o clorofórmio (P.A) como solvente. A olho nu as sementes começaram a ficar com o aspecto murcho, sua cor escura e o extrato vermelho intenso.

Por fim na quarta etapa da extração, foi utilizado o solvente álcool etílico (P.A) após a exposição das sementes para a secagem por mais 20 minutos. Durante os cinco dias da extração, a solução que escorria da corneta extrato para o balão de fundo redondo, ficou visivelmente com uma tonalidade mais incolor. O processo de lavagem foi interrompido quando a solução que escoou do aparelho Soxhlet para o frasco de fundo redondo ficou transparente e as sementes de urucum, escuras.

Ao final de cada etapa, foram destilados os extratos adquiridos a fim de recuperá-los, bem como os materiais extraídos para as caracterizações, conforme mostra de maneira resumida a Figura 10.

Após o processo da destilação e secagem em estufa, a fração sólida, obtida da extração com água destilada, foi observado um material de coloração escura e de aspecto higroscópico. Da etapa da extração hexano (P.A) obteve-se um material oleoso com duas fases uma menos densa e de tonalidade vermelho intenso e outra de coloração laranja. Na etapa da extração clorofórmio (P.A) e álcool etílico (P.A) respectivamente, foi separada por filtração, e obteve-se a forma pura de microcristais de bixina com tonalidade vermelho-púrpura.

Figura 10 - Resumo dos procedimentos realizados para a extração do material.



Fonte: Autor (2023).

Terminado o processo de extração armazenou-se os materiais em recipiente âmbar para proteção da luz. Após isso, quantificou-se, em massa, os materiais extraídos. Com relação as sementes, uma parte foram avaliados os teores de minerais das suas cinzas antes da extração (sementes *in natura*) e após a extração (sementes tratadas), a outra parte foi descartada.

3.3 METODOLOGIA PADRÃO DE REFERENCIA

A metodologia descrita, foi desenvolvida partindo do princípio de que nas sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) possuem compostos bioativos lipossolúveis e hidrossolúveis, logo entende-se que alternando o uso de solventes de polaridades diferentes é possível extrai-los em cada etapa da extração.

A fim de uma possível a viabilidade da metodologia desenvolvida, foi comparado com o método utilizado por Husa *et al.*, (2018), com alterações. Nesse sentido, separou-se 4 lotes de sementes de urucum, para cada lote pesou-se 50 gramas de sementes, alternando com 400 mL para cada tipo de solvente utilizado.

O quadro 2 ilustra o lote de sementes utilizado na pesquisa, para cada lote utilizou-se a nomenclatura do solvente que iniciou o processo de extração bem como a sequência de solventes utilizadas para cada lote de semente utilizado.

Quadro 2 - Sequência de solventes utilizados.

Lote	Solvente/Etapa
Semente Água	Água
	Hexano
	Clorofórmio
	Álcool Etílico
Semente Hexano	Hexano
	Clorofórmio
	Álcool Etílico
	Água
Semente Clorofórmico	Clorofórmio
	Álcool Etílico
	Água
	Hexano
Semente Álcool Etílico	Álcool Etílico
	Água
	Hexano
	Clorofórmio

Fonte: Autor (2023).

A mistura das sementes de urucum com o solvente foi agitada em agitador digital (IKA, RW-20) durante uma hora para cada solvente utilizado uma frequência de 500 rpm até a completa extração da cor das sementes (Figura 11). Entre um solvente e outro esperou-se secar as sementes para eliminar os riscos de contaminação. O material extraído foi filtrado usando papel Whatman grau 595 com tamanho de poro variando de 4 - 7 μm . Após o processo de extração, recuperou-se o solvente em evaporador rotativo e o precipitado foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas.

Figura 11- Processo de extração de compostos bioativos segundo a norma



Fonte: Autor (2023).

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EXPRESSOS EM BIXINA POR ESPECTROFOTOMETRIA

De acordo com a norma proposta pelo Instituto Adolfo Lutz, preparou-se uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 0,5% que consistiu em pesar 5 g de hidróxido de potássio (KOH) utilizando balança analítica digital FA 2012N e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL.

Pesou-se, 0,1 g do corante em pó, do material extraído e transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL com hidróxido de potássio 0,5%. Pipetou-se 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com hidróxido de potássio (KOH) 0,5% (Figura 12).

Figura 12 - Solução corante filtrada de semente de urucum (1) e extrato alcalino da semente de urucum (2).



Fonte: Autor (2023).

Ajustou-se o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 453 nm, utilizando a solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5% como branco e cubetas de 1 cm. Utilizou-se as seguintes fórmulas para a determinação da concentração molar da Bixina:

$$\eta = \frac{m1}{M \cdot V} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

η = Concentração molar (mol/L).

$m1$ = massa da bixina (g).

M = Massa Molar da Bixina (g/mol).

V = Volume da solução (L).

Concentração da Bixina após a diluição:

$$\eta_i \cdot V_i = \eta_f \cdot V_f \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

η_i = Concentração molar inicial (mol/L).

V_i = Volume da solução inicial (L).

m_f = Concentração molar final (mol/L).

V_f = Volume da solução final (L).

Os espectros de absorção obedecem a uma relação linear entre a absorbância e a concentração de uma espécie absorvente, ou seja, à lei de Beer-Lambert (RODRIGUEZ, 2001), que pode ser representada pela seguinte fórmula:

$$A = E_0 \cdot l \cdot m_f \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

A : absorbância;

E_0 : coeficiente de absorção (mol/L · cm);

l : comprimento do caminho óptico (cm);

m_f : concentração molar (mol/L).

O Cálculo do teor de carotenoides totais expresso em norbixina usando o valor de absortividade: $E_0 = 3473$.

Para expressar o resultado em bixina, deve-se multiplicar o teor de norbixina encontrado pelo fator 1,037.

Utilizou-se a Espectrofotometria do Ultravioleta/Visível (UV-VIS) para compararmos os picos específicos de carotenoides nos solventes utilizados, bem como analisarmos o teor do material adquirido.

A norma foi utilizada para a determinação do teor de carotenoide totais expressos em bixina no material extraído segundo a metodologia proposta e para a metodologia segundo Husa *et.al.*, (2018) para a análise do padrão de comparação.

4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS EXTRAÍDOS

As caracterizações físico-químicas dos materiais extraídos foram realizadas nos Laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais (PPGEM) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI). As caracterizações de MEV e FTIR foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e Instituto de Criminalística "Vital Araújo" Polícia Civil do Estado do Piauí (PCPI) respectivamente.

4.1 DE ACORDO COM METODOLOGIA PROPOSTA

4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros dos materiais extraídos foram obtidos em infravermelho (FTIR) realizada em espectrômetro *Bruker Alpha II ATR platinum T Diamond*, utilizando acessório ATR (reflectância total atenuada) e cristal de diamante, na região de 4000-600 cm^{-1} com 32 varreduras (*scans*) e resolução de 4 cm^{-1}

4.1.2 Análise por Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção molecular no ultravioleta/visível foram obtidos em espectrômetro de duplo feixe SHIMADZU, modelo UV-2401 PC. Foram preparadas soluções padrões dos materiais extraídos, usando álcool e clorofórmio como solventes. Para efetuar as análises, foram colocadas 5 a 10 gotas das soluções preparadas em cubetas de quartzo de 4 mL de capacidade com preenchimento da capacidade restante com solvente, em seguida, foram submetidas à análise espectral em faixa de varredura entre 600 nm a 200 nm. Logo foi observado a absorção molecular dos extratos líquidos (após a agitação) e secos (após o processo de recuperação do solvente e secagem em estufa).

4.1.3 Análise Termogravimétrica e Gravimetria Derivada TG/dTG

As curvas de análise termogravimétrica e gravimetria derivada foram obtidas simultaneamente no aparelho SDT Q600, da TA INSTRUMENTOS, utilizando a

razão de aquecimento de 10 °C/min, no intervalo entre 25 a 1000 °C, utilizando atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 50 mL/min.

4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises DSC foram realizadas num analisador térmico modelo DSC-60 plus. Foram usadas placas de alumínio que foram aquecidas de 25 °C a 600 °C numa taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹. Foi usada em média 8,0 mg de amostra em cada placa.

4.1.5 Cinzas

Para a análise, foi utilizado o método gravimétrico segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz com alterações (BRASIL, 2005a). Essas alterações se justificam devido a massa das cinzas serem utilizadas para a análise de Fluorescência de Raios-X (FRX).

Ao final das etapas da extração, com a finalidade de determinar o teor de cinzas (resíduo mineral fixo), foram pesados 20g das sementes (antes e depois da extração) em cadinho de porcelana previamente tarado e colocado em forno a uma temperatura de 600°C até a degradação de toda a matéria orgânica.

4.1.6 Fluorescência de Raios-X (FRX)

Para esta análise foi utilizado um Espectrômetro por Fluorescência de Raios-X, modelo Epsilon 3 - XL da Panalytical, utilizando modo omnian, em ambiente de ar atmosférico e gás nitrogênio).

4.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Dispersão em Energia acoplada (MEV-EDS)

As micrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão a emissão por campo, marca FEI, modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001, detector Apollo X-SDD. Amostras foram

fixadas em fita adesiva dupla face de carbono, aterradas com tinta adesiva condutora de prata, e recobertas com Ouro (Au) na metalizadora, marca Quorum, modelo Q150R, durante 30s, a 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio.

4.1.8 Análise do teor de pigmentos do material extraído.

A análise do teor de carotenoides totais expressos em bixina foi realizada pelo método espectrofotométrico do Instituto Adolfo Lutz. Para a determinação foi utilizado 0,1 gramas do material extraído e diluído em hidróxido de potássio (KOH), posteriormente, foi realizada a leitura em comprimento de onda de absorção máxima 453 nm utilizando hidróxido de potássio (KOH) como branco nas leituras.

4.2 DE ACORDO COM A NORMA UTILIZADA PARA COMPARAÇÃO

4.2.1 Análise por Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção molecular no ultravioleta/visível foram obtidos em espectrômetro de duplo feixe SHIMADZU, modelo UV-2401 PC. Foram preparadas soluções padrões dos materiais extraídos, usando álcool e clorofórmio como solventes. Para efetuar as análises, foram colocadas 3 a 5 gotas das soluções preparadas em cubetas de quartzo de 4 mL de capacidade com preenchimento da capacidade restante com solvente, em seguida, foram submetidas à análise espectral em faixa de varredura entre 600 nm a 200 nm.

Utilizou-se a Espectrofotometria do Ultravioleta/Visível (UV-VIS) para compararmos os picos específicos de carotenoides nos solventes utilizados, bem como analisarmos o teor do material adquirido. Logo foi observado a absorção molecular dos extratos líquidos (após a agitação) e secos (após o processo de recuperação do solvente e secagem em estufa).

4.2.2 Análise do teor de pigmentos do material extraído

A análise do teor de carotenoides totais expressos em bixina foi realizada pelo método espectrofotométrico do Instituto Adolfo Lutz. Para a determinação foi utilizado 0,1 gramas do material extraído e diluído em hidróxido de potássio (KOH),

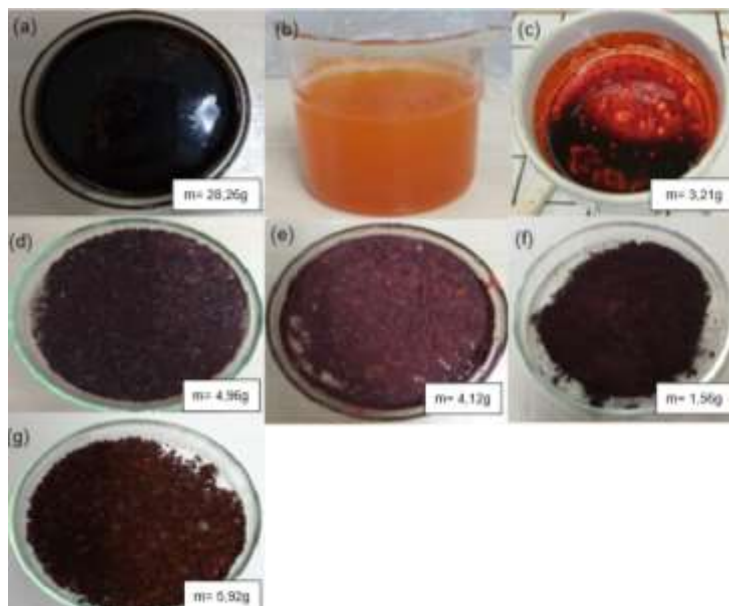
posteriormente, foi realizada a leitura em comprimento de onda de absorção máxima 453 nm utilizando hidróxido de potássio (KOH) como branco nas leituras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os compostos bioativos obtidas das sementes de urucum (*Bixa orellana L.*), após o isolamento notou-se que cada etapa, possuía visualmente características diversas, como observado na Figura 13. Na etapa da extração com água destilada o material apresentou coloração escura. Quando dissolvido em água, sua tonalidade ficou amarelada com um aspecto higroscópico e aroma adocicado. Os compostos extraídos com o hexano (P.A) apresentaram duas fases com características oleosas. Uma menos densa de coloração vermelha e outra de coloração alaranjada. Na etapa da extração com clorofórmio (P.A) foi verificado que a bixina apresentou coloração violeta e por possuir polaridade intermediária dissolveu-se bem tanto no álcool quando no clorofórmio, o mesmo foi observado para a etapa da extração com álcool (P.A), com a diferença na textura dos materiais sólidos, isso provavelmente devido ao solvente utilizado, a metodologia adotada na extração ou até mesmo devido a reação de isomerização no momento da recuperação do solvente, como descrito por (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018; RAHMALIA *et al.*, 2014).

O extrato sólido foi quantificado com uma massa de 48,03 g. representando um rendimento de aproximadamente 24% de material extraído. O material caracterizado como bixina, apresentou uma massa de aproximadamente 16,56 g.

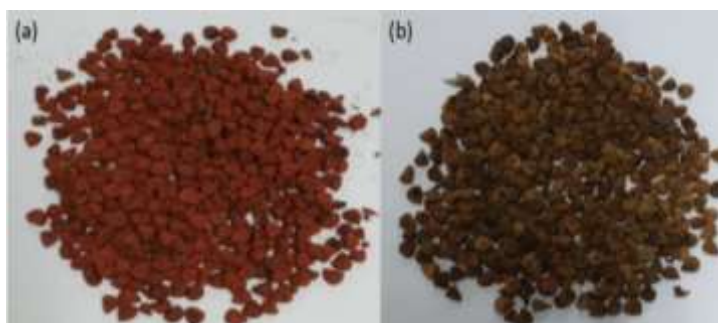
Figura 13 - Materiais obtidos durante as etapas da extração: Extração água **(a)** Extração Hexano **(b)**; Extração Hexano **(c)**; Extração Clorofórmio **(d)**; Etapa da Extração Álcool **(e)**.



Fonte: Autor (2023).

Com relação às sementes *in natura*, foi nítida a mudança de coloração (Figura 14), indicando que o material extraído se encontra na superfície do grão, corroborando com os trabalhos de STRINGHETA; SILVA E COSTA (2018). A massa final das sementes foi de 147,89 g, fazendo a diferença entre a massa de partida (*in natura*) e a massa final (tratada), houve uma perda de aproximadamente 4,08 g de material, ocasionada devido a lavagem, filtração, pesagem e até mesmo na troca de recipientes para armazená-lo.

Figura 14 - Sementes de urucum *in natura* (a) e tratada (b)

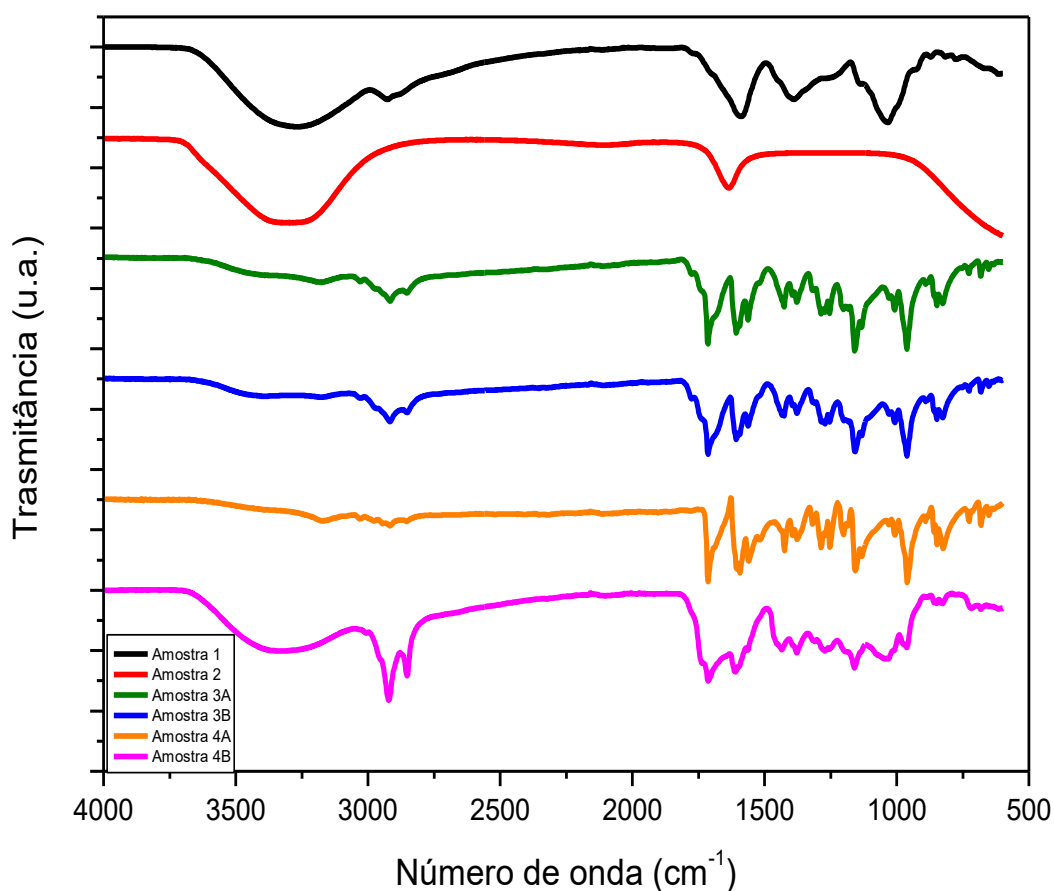


Fonte: Autor (2023).

5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

No espectro da amostra 1 (Figura 15) é apresentado uma banda ampla e intensa em 3268 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento da ligação (O-H). O pico em 2928 cm^{-1} é atribuído ao estiramento assimétrico (C-H) dos grupos metil (CH_3). Banda intensa e estreita em 1589 cm^{-1} é o grupo funcional do anel aromático, especificamente as vibrações de estiramento C=C (carbono-carbono) em ligações duplas conjugadas. Essa região do espectro é característica das vibrações de estiramento das ligações duplas conjugadas presentes em anéis aromáticos, como o benzeno.

Figura 15 – Gráfico do Espectros de FTIR dos materiais extraídos das sementes de urucum (*Bixa Orellana L.*) nas etapas de água (Amostra 1) e hexano (Amostra 2) e do pó de bixina (Amostras 3A, 3B, 4A, 4B)



Fonte: Autor (2023).

A banda média e estreita em 1389 cm^{-1} é geralmente atribuído às vibrações de deformação angular (dobramento) C-H em grupos metil (CH_3), essa região do

espectro é característica das ligações C-H em cadeias alifáticas ramificadas. A banda estreita e intensa em 1033 cm^{-1} é atribuída a um álcool primário (O-H). Provavelmente nessa etapa da extração a água, que é um composto polar inorgânico, tenha arrastado muitas outras substâncias, formando um material com bandas de absorção em faixas que as diferem de bixina.

A Tabela 3 resume as principais atribuições para as bandas de absorção observadas para o material extraído com água.

Tabela 3 - Atribuições para as bandas de absorção do material extraído com água.

	Número de ondas (cm^{-1})	Atribuições
Amostra 1	3268	Vibrações de estiramento da ligação (O-H).
	2928	Estiramento assimétrico (C-H) do grupo metil
	1589	Vibrações de estiramento (C=C) em ligações
	1389	duplas conjugadas Deformação angulas

Fonte: Autor (2023).

A curva da amostra 2 (Figura 15) possui bandas de absorção na região do espectro de 3317 cm^{-1} atribuído a presença do grupo hidroxila (O-H) de álcool e está associado a absorção que ocorre devido as vibrações de estiramentos das ligações O-H. A banda alargada porem de baixo sinal em 2111 cm^{-1} indica a presença do estiramento da ligação de alcinos ($\text{C}\equiv\text{C}$). Banda de intensidade variável e estreita em 1636 cm^{-1} representa estiramento de alcenos não conjugados ($\text{C}=\text{C}$). A região de absorção com número de ondas em 858 cm^{-1} e 731 cm^{-1} é atribuída ao anel aromático de 2 e 5 átomos de hidrogênios respectivamente. O material analisado é resultado da extração com hexano, um solvente orgânico apolar, que possivelmente, pode ter arrasta consigo muitos constituintes durante a extração, gerando um material com propriedades não características de bixina, como observado no FTIR.

A Tabela 4 resume as principais atribuições para as bandas de absorção observadas para o material extraído com hexano.

Tabela 4 - Atribuições para as bandas de absorção do material extraído com hexano.

	Número de ondas (cm ⁻¹)	Atribuições
Amostra 2	3317	Vibrações de estiramento grupo (O-H).
	2111	Estiramento de alcinos (C≡C).
	1636	Vibrações de estiramento (C=C) não conjugados.
	858 e 731	Anel aromático com 2 e 5 átomos de hidrogênio respectivamente

Fonte: Autor (2023).

No espectro de FTIR para as amostras de bixina (Amostras 3A, 3B, 4A, 4B) (Figura 15) a região entre 3900 a 3000 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento (O-H) de ácido carboxílico, essas bandas de estiramento estão condizentes com os trabalhos de (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2021; RAHMALIA; FABRE; MOULOOUNGUI, 2015; RAO *et al.*, 2014).

Da mesma forma que as bandas de absorção forte e estreita em torno de 1714 cm⁻¹ e 1254 cm⁻¹ foram atribuídas ao estiramento (C=O) do ácido, resultado semelhante foi encontrado por (RAO *et al.*, 2014).

A vibração alifática referente ao grupo metil (CH₃) ocorreu em 2916 cm⁻¹ e 2922 cm⁻¹ essa variação provavelmente é devido ao uso do solvente utilizado durante a extração, vibrações similares foram encontradas por (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Bandas de absorção em 1607cm⁻¹ e 1609 cm⁻¹ e 1593 cm⁻¹ indicam alongamento da ligação alceno (C=C), resultados parecidos foram encontrados por (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2021; RAHMALIA; FABRE; MOULOOUNGUI, 2015).

Em 1158 cm⁻¹ e 1159 cm⁻¹ vibrações simétricas e assimétricas do grupo éster (C-O-C), essas banda foram iguais as encontradas na análise de (RAHMALIA; FABRE; MOULOOUNGUI, 2015)

Estiramentos em 1033 cm⁻¹, 1006 cm⁻¹, e 1008 cm⁻¹ são atribuídos a flexão assimétrica de (C-H) corroborando aos resultados encontrados por (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Em 961 cm⁻¹ vibração de balanço metileno do tras-carotenóide semelhantes as bandas encontradas por (RAHMALIA; FABRE; MOULOOUNGUI,

2015; RAO *et al.*, 2014). Em 848 cm^{-1} e 850 cm^{-1} metileno terminal do cis-carotenóide idênticos as bandas listadas por (DOS SANTOS *et al.*, 2021). Todas essas bandas de absorção na FTIR estão relacionadas a bixina. A Tabela 5 resume as principais atribuições para as bandas de absorção observadas para a bixina (amostras 3A, 3B, 4A, 4B).

Tabela 5 - Atribuições para as bandas de absorção da bixina.

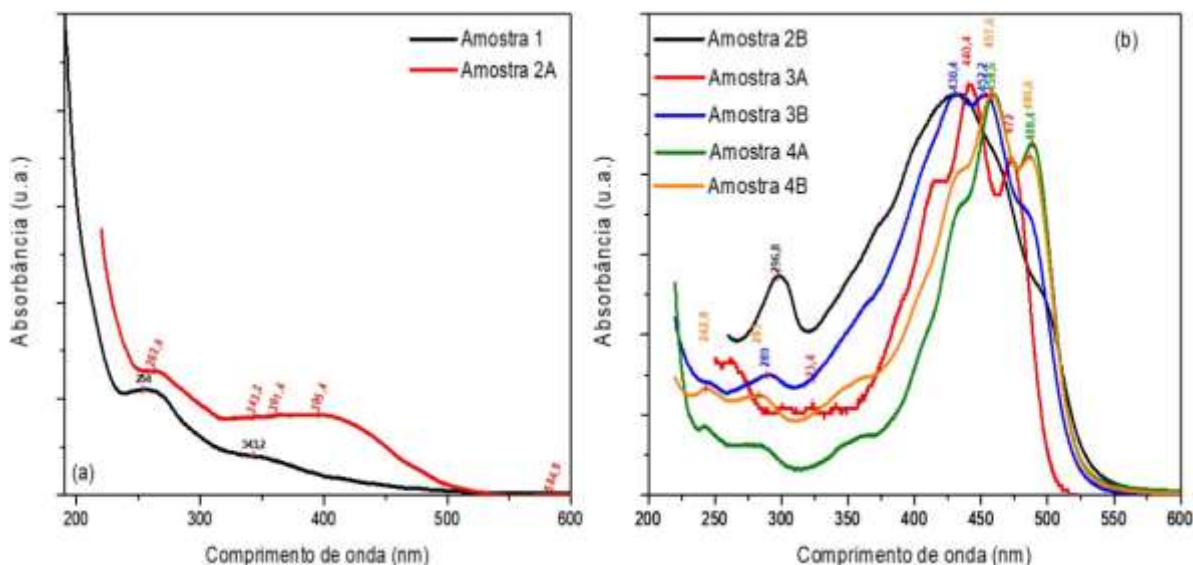
	Número de ondas (cm^{-1})	Atribuições
Bixina	3900 a 3000	Vibrações de estiramento grupo (O-H) de ácido
	2922 3 2916	Vibrações alifáticas referentes ao grupo metil (-CH ₃)
	1714 e 1254	Estiramento (C=O) de ácido
	1609 e 1607	Vibrações de estiramento (C=C) de alcenos
	1159 e 1158	Vibrações simétricas e assimétricas do grupo éster (C-O-C)

Fonte: Autor (2023).

5.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS)

O espectro UV/Visível das amostras extraídas estão apresentados no gráfico 2. A Figura 16 (a), ilustra os materiais com bandas de absorção não específica de carotenoides, enquanto o gráfico 2 (b), ilustra os materiais com bandas de absorção típicas de carotenoides.

Figura 16 - Espectro de absorção UV-Vis das amostras extraídas com água (amostra 1) e hexano (amostra 2 A) (a) e das amostras de bixina (3A, 3B, 4A, 4B) (b).



Fonte: Autor (2023).

A Figura 16 (a) apresenta duas bandas de absorção na região do ultravioleta, o de λ_{max} 254 nm e o outro em 343,2 nm. O espectro da amostra 2A, possui cinco picos nas regiões de 262,4 nm, 343,2 nm, 361,4 nm, 395,4 nm e 584,8 nm. Existem regiões muito similares nas duas curvas entre 200 nm e aproximadamente 350 nm, isso pode ser atribuído ao fato da extração com o hexano carregar consigo alguma mistura de materiais que veio da primeira etapa da extração, sendo detectado no momento da análise. Por não terem espectros de absorção característicos do carotenoide bixina, esses achados estão condizentes com a caracterização por Espectrometria no Infravermelho (FTIR) observados na Figura 15.

Wang *et al.*, (2017) detalha que a região do Ultravioleta UV, representa uma parte do espectro solar dividida em três faixas de absorção, raios UVC (100 -290 nm) absorvida pela atmosfera, raios UVB (290 a 320 nm) que estão associados ao bronzeamento indireto e tardio e raios UVA (320 a 400 nm) causadores da pigmentação imediata e de curta duração, sendo classificados em: UVA I (340 – 400 nm) e UVA II (320 – 400 nm). De acordo com a região que fornece a proteção, os filtros químicos são classificados em UVA e UVB pois, nem sempre apresentam um amplo espectro de fotoproteção (DO NASCIMENTO; DOS SANTOS; DE AGUIAR, 2014).

A radiação Ultravioleta UV é responsável por cerca de 90% dos prejuízos causados à pele (VOLKOVOVA *et al.*, 2012). Logo, é necessário proteger a pele

contra a ação dessas radiações por seus efeitos serem prejudiciais para o organismo humano.

Ambos os materiais têm absorção em comprimentos de onda muito distantes e na faixa de aproximadamente 340 a 400 nm, provavelmente esses materiais associados com outros filtros químicos, sejam importantes para a fotoproteção. RIBEIRO (2010) esclarece que essa faixa de absorção é característica da faixa do UVA longo e está relacionada diretamente com o fotoenvelhecimento e o câncer de pele, além de ser uma região difícil de ser alcançada por alguns filtros químicos.

As amostras analisadas por espectrofotometria UV/Visível (gráfico 2 (b)), apresentam bandas de absorção em comprimentos de onda em picos de 296,8 nm e 434,4 nm, material da extração com hexano após filtragem aderido ao papel filtro (amostra 2B); 323,4 nm, 440,4 nm e 472 nm (amostra 3A); 289,0 nm 430,4 nm e 452,2 nm (amostra 3B); 458,6 nm e 488,4 nm (amostra 4A) e 242,8 nm, 283,0 nm, 457,6 nm e 486,6 nm (amostra 4B).

Em seus trabalhos, Stringheta (2018) e Saini et al., (2022) afirmam que para os carotenoides a espectrofotometria UV/Visível (gráfico 2 (b)), geralmente mostra três picos de comprimentos de onda de absorção máxima (nm), onde o primeiro é somente um ponto de inflexão, o segundo está localizado em aproximadamente 452 nm e o terceiro próximo de 476 nm. No carotenoide bixina, suas medidas de absorbância possuem dois picos principais para a determinação, sendo que o preferido é aquele mais deslocado à direita, ou seja, próximo a 476 nm, uma vez que neste comprimento de onda há menos interferência da possível presença de produtos da decomposição amarelos, que ficam sobrepostos na curva espectral (SCOTTER, M. J. *et al.*, 1994; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

Segundo CALOGERO *et al.*, (2015) a bixina exhibe bandas de absorção acima de 400 nm devido a uma transição eletrônica-dipolo orientada ao longo do eixo da molécula. Logo, para carotenoides como a bixina a transição mais importante é a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, neste sistema conjugado, os elétrons π são altamente deslocalizados e o estado excitado é de energia comparativamente baixa (DOS SANTOS *et al.*, 2021). A energia necessária para provocar a transição é relativamente baixa, o que corresponde à absorção na região do visível, pode ser atribuído aos dois picos acima de 400 nm obtidos no espectro. A maior intensidade de picos acima de 400 nm é característica do carotenoide bixina (CALOGERO *et al.*,

2015; PEROTTI *et al.*, 2020; RAHMALIA *et al.*, 2014; SCOTTER, M. J. *et al.*, 1994; SCOTTER, MICHAEL J., 1995; SCOTTER, MICHAEL J *et al.*, 2000)

Na amostra 2B apesar de termos o ponto de inflexão e uma absorbância na faixa desejada de carotenoides (434,4 nm), não existe o pico mais deslocado a direita, isso ocorre, provavelmente, devido esse material, arrastar substâncias da etapa anterior da extração, ainda vir misturado a outras substâncias.

Para os materiais 3A, 3B, 4A e 4B sugere-se que sejam do carotenoide bixina. Comparando seus picos de absorção, existem pequenas diferenças, sendo uns mais deslocados a direita e outros mais à esquerda. RAHMALIA *et al.*, (2014) e HUSA *et al.*, (2018) comparando os espectros do UV/visível da bixina obtidos com esses solventes (clorofórmio e álcool) revelou uma pronunciada dependência do solvente, essa característica é típica dos espectros de absorção eletrônica de compostos de polieno. Analisando a estrutura da bixina, que possui 25 átomos de carbono e grupos terminais de ácido e éster metílico, ele é mais polar do que outros tipos de carotenoides normalmente de cadeias com 40 átomos de carbono, e esta molécula tem maior afinidade por solventes de polaridade média (CHISTÉ; YAMASHITA; *et al.*, 2011; SILVA, G. F. *et al.*, 2008)

Segundo Silva (2007), os carotenoides não apresentam absorção nos comprimentos de onda da região correspondente a ultravioleta. Para RAHMALIA *et al.* (2015), as duplas ligações conjugadas presentes na estrutura da bixina constituem o grupo cromóforo absorvedor de luz, resultando na forte banda de absorção acima de 400 nm, como observado nesta análise de UV-Vis (Figura 16 (b)).

Os picos abaixo de 400 nm observados nas amostras se deve provavelmente pela formação da cis-bixina (DOS SANTOS *et al.*, 2021). PEROTTI *et al.*, (2020) e dos SANTOS *et al.*, (2021) justificam que essas bandas fracas de absorção na região do UV (296,9 nm/ amostra 2B; 393,4 nm/amostra 3A; 289 nm amostra 3B; (283 nm/ amostra 4B) são atribuídas à transição do estado fundamental para um estado excitado mais alto, que só é permitido nos isômeros cis dos carotenoides. Os espectros de absorbância desses isômeros estão condizentes com os resultados encontrados nas bandas de absorção indicadas na Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), observados no Figura 15.

5.3 ANÁLISE do UV-VIS (ULTRAVIOLETA-VISÍVEL) DOS MATERIAIS EXTRAÍDOS DE ACORDO COM O PADRÃO DE REFERÊNCIA

Após cada etapa da extração, separou-se uma parte do material para análise do extrato líquido e a outra após o processo de remoção do solvente, cristalização e secagem.

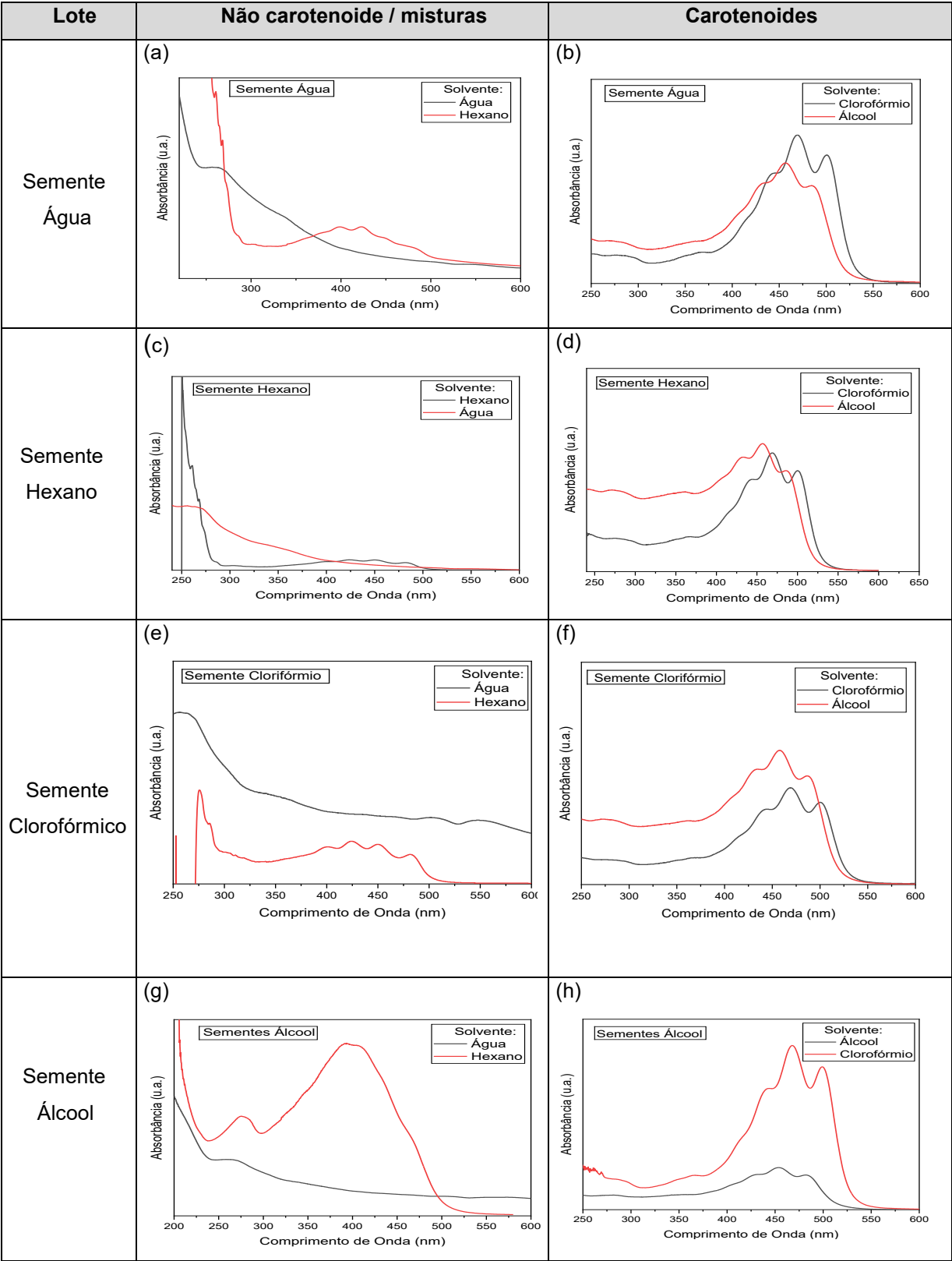
5.3.1 Extratos líquidos

O quadro 3 é formada por gráficos dos lotes das sementes de cada etapa da extração. Dos extratos líquidos fez-se a análise espectrofotométrica na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis), utilizando como branco o solvente utilizado em cada etapa da extração. O estudo foi realizado para termos parâmetros comparativos aos realizados na metodologia proposta nesse trabalho.

Para os extratos líquidos, observou-se que nas etapas analisadas independente da alternância da semente utilizada no processo, o uso do solvente Água (P.A), não evidencia regiões do espectro de absorção específicas de carotenoides (quadro 3: a, c, e, g), estudos semelhantes foram destacados por (RAHMALIA *et al.*, 2014; RIVERA-MADRID *et al.*, 2016), e próximas as encontrados na metodologia da extração proposto nesta pesquisa, como observado no Figura 16 (a).

A etapa do solvente Hexano (P.A) as regiões do espectro de absorção indicaram que os compostos extraídos vinham carregados com várias misturas, provavelmente trazidas dos compostos que compõe a semente ou até mesmo de restos de impurezas da etapa anterior do processo, isso provavelmente acontece devido o solvente utilizado ser bastante apolar como afirmam (RAHMALIA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2019a; BAPTISTÃO, 2020; GUINAZ *et al.*, 2009). Na etapa do Hexano (P.A), observado no gráfico 2 (a, b) devido a metodologia empregada observou-se duas curvas do espectro de absorção, devido nessa etapa da extração obter-se solventes de densidades diferentes, mesmo assim estão condizentes com os gráficos descritos na norma utilizada para comparação. Esses resultados estão de acordo com os propostos por (COLOSIMO *et al.*, 2022; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015; HUSA *et al.*, 2018; RAHMALIA *et al.*, 2018).

Quadro 3 - Materiais líquidos extraídos em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b, d, f, h).



Fonte: Autores (2023).

A etapa da extração em que foi utilizado o Clorofórmio (P.A) e o Álcool (P.A) (quadro 3 (b, d, f, h)) ocorreram em regiões do espectro de absorção específicos de carotenoides, evidenciado serem os melhores solventes, dentre os utilizados, para a extração de carotenoides como indica (RAO *et al.*, 2014; MARCOLINO *et al.*, 2011; SILVA, MARTA C.D. *et al.*, 2005). Esses resultados são similares aos demonstrados segundo a metodologia proposta nessa pesquisa, como observados no Figura 16 (a) (b). Picos com absorbâncias mais intensas e mais deslocados à direita evidencia o solvente influenciando na análise como demonstra os estudo de Stringheta (2018), Saini *et al.*, (2022) e MARCOLINO *et al.*, 2011.

5.3.2 Extratos sólidos

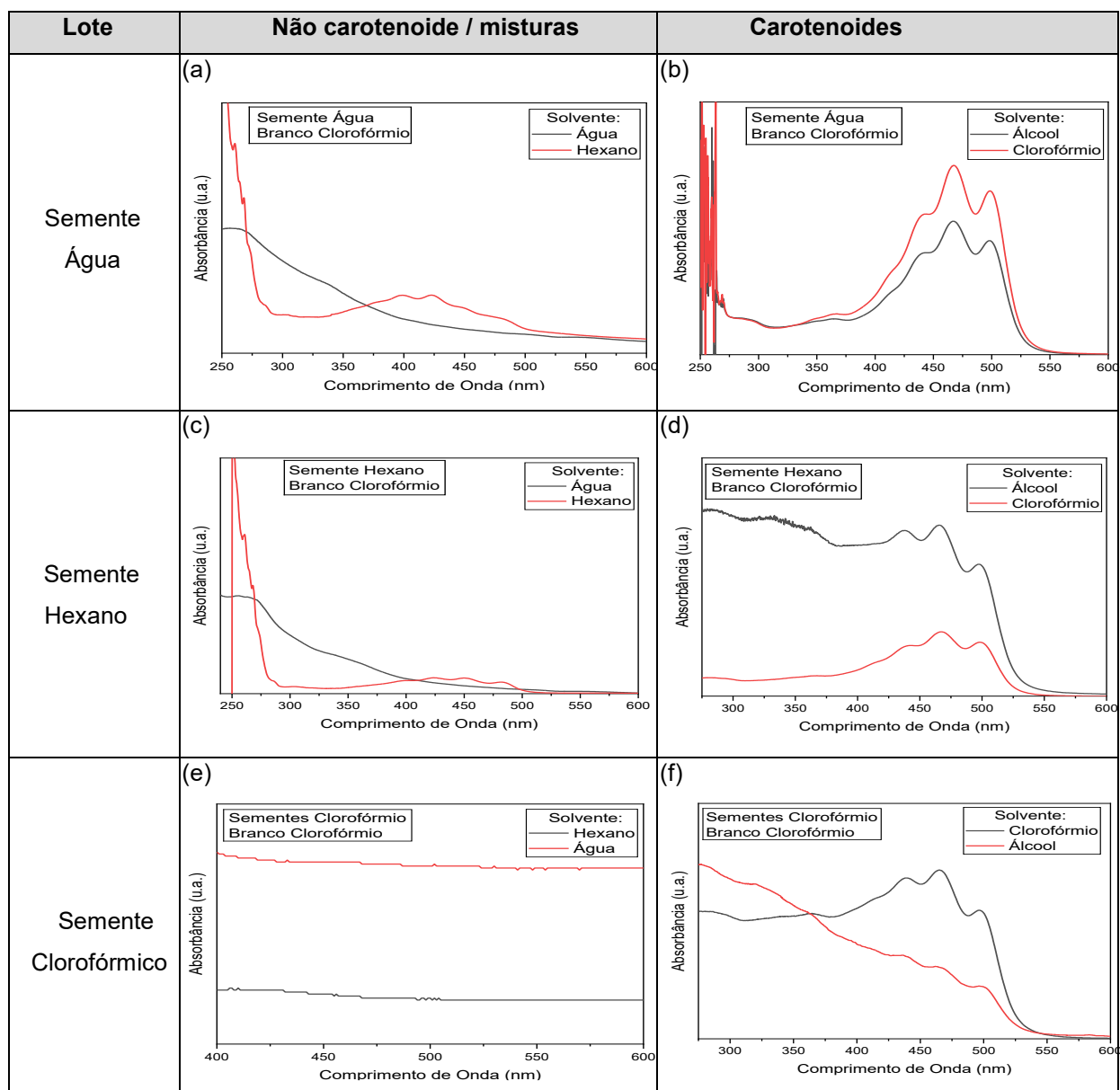
Os quadros 4 e 5 são formados por gráficos dos lotes das sementes de cada etapa da extração. Dos extratos sólidos fez-se a análise espectrofotométrica na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis), utilizando como branco os solvente Clorofórmio (quadro 4) e Álcool (quadro 5). O estudo foi realizado para termos parâmetros comparativos aos realizados na metodologia proposta nesse trabalho.

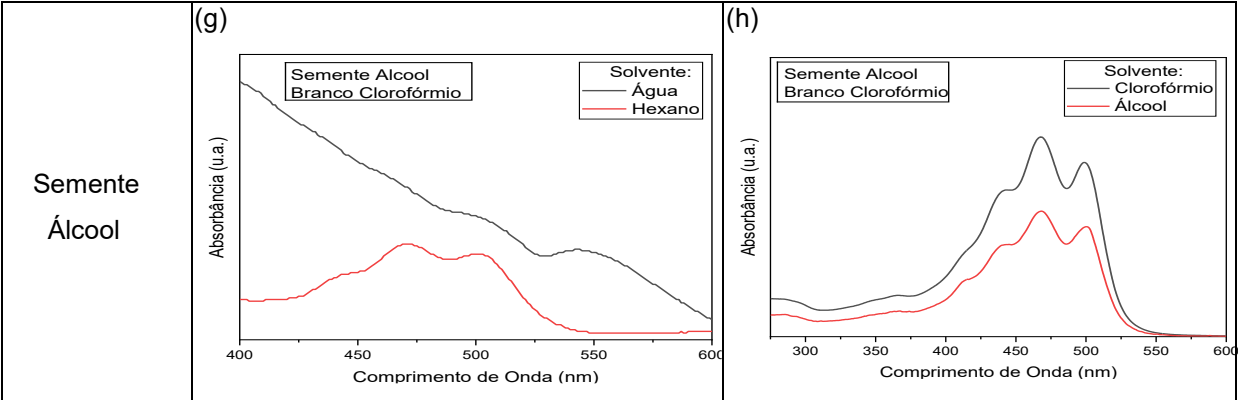
Para os extratos sólidos (quadro 4 (a, c, e, g)) e (quadro 5 (a, c, e, g)), analisados com brancos diferentes, não muito diferente dos resultados encontrados para os extratos líquidos (quadro 3: a, c, e, g) observou-se que nas etapas analisadas independente da alternância da semente utilizada no processo, o uso do solvente Água (P.A), não evidencia regiões do espectro de absorção específicas de carotenoides, estudos semelhantes foram destacados por (RAHMALIA *et al.*, 2014; RIVERA-MADRID *et al.*, 2016), parecidos aos resultados encontrados na metodologia da extração proposto nesta pesquisa, como observado no Figura 16 (a).

Com relação aos resultados encontrados para materiais com picos de absorção típicos de carotenoides (quadro 4 (b, d, f, h)) e quadro 5 (b, d, f, h)), também não houve diferença significativa do ponto de vista das regiões de comprimentos de onda dos observados para os extratos líquidos (quadro 3: a, c, e, g) também semelhantes aos resultados encontrados na metodologia da extração proposto nesta pesquisa, como observado no gráfico 2 a e b. RAHMALIA *et al.*, (2014) fazendo uma comparação dos espectros de Ultravioleta- Visível (UV-Vis) da bixina obtidos com vários solventes revelou uma pronunciada dependência do

solvente, uma característica típica dos espectros de absorção eletrônica de compostos de polieno.

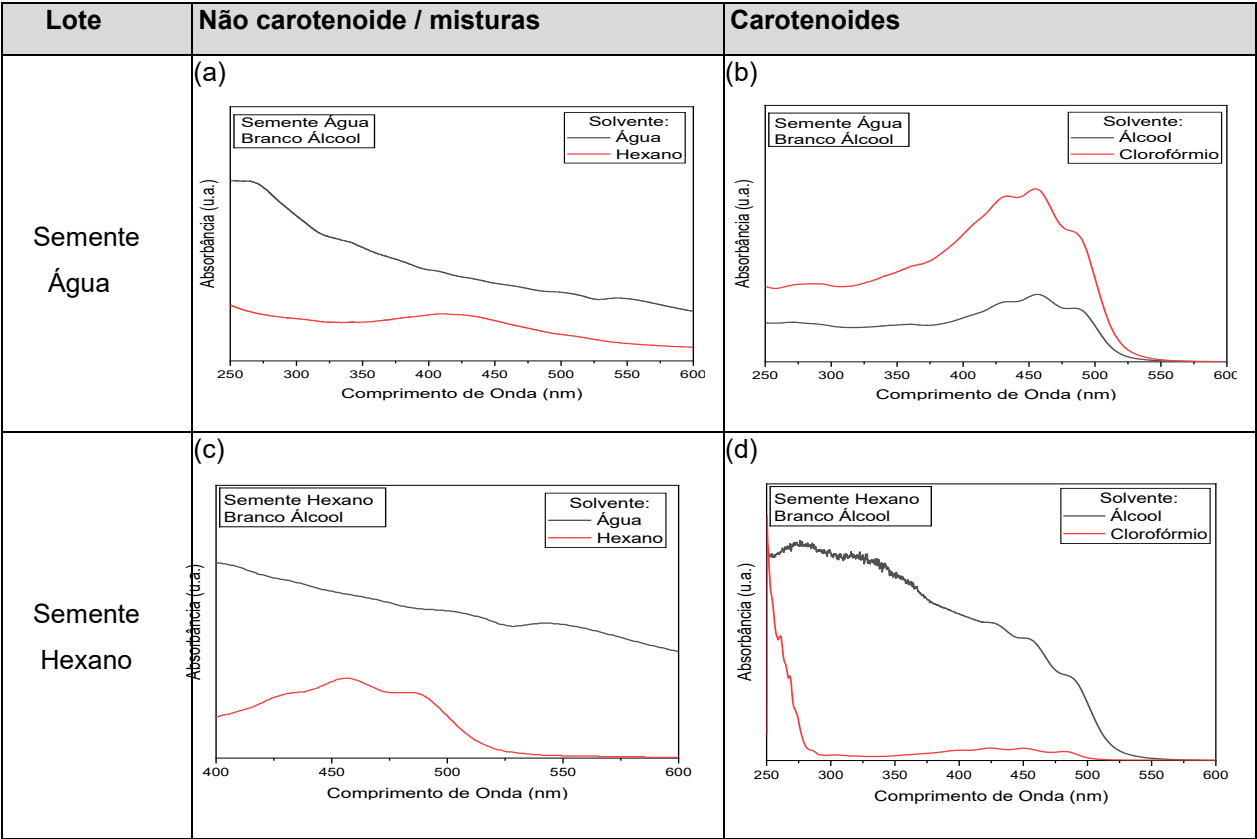
Quadro 4 - Materiais sólido extraídos após secagem em estufa em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b, d, f, h), utilizando como branco Clorofórmio.

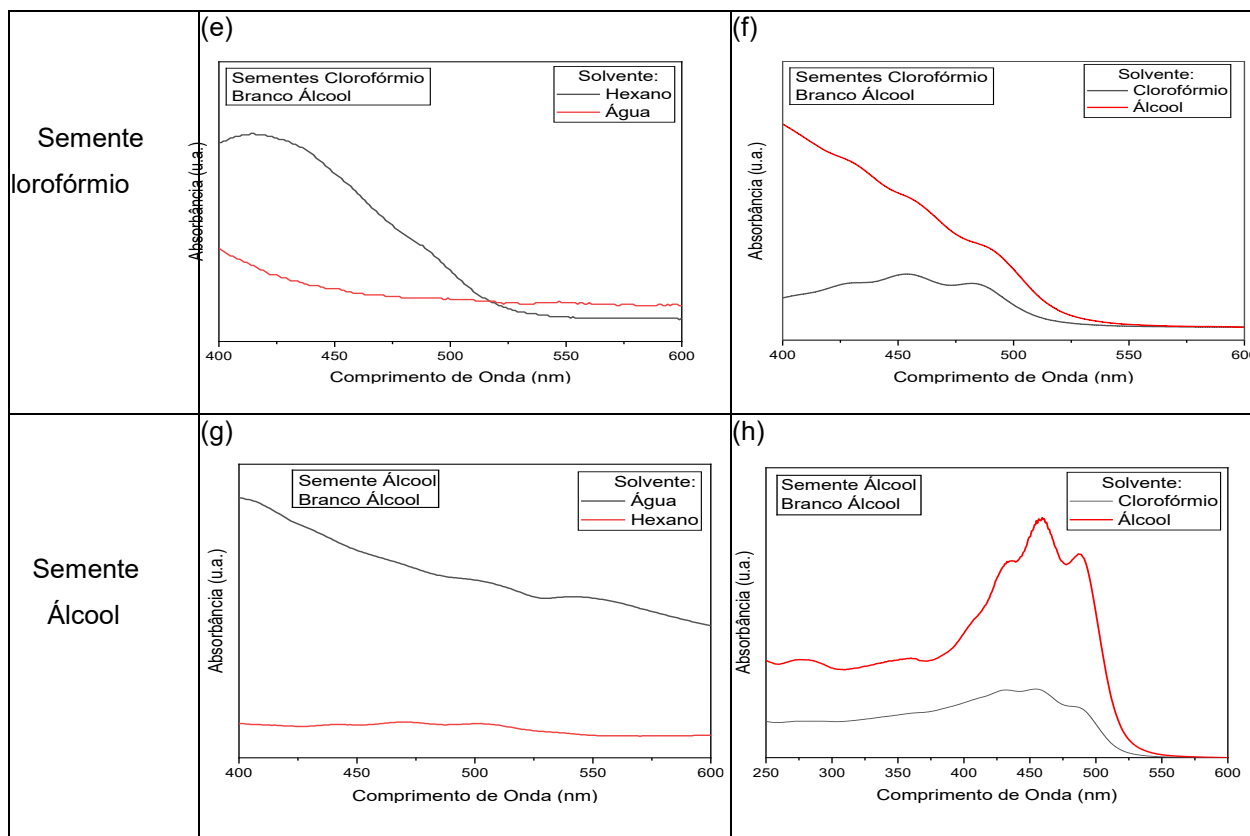




Fonte: Autores (2023)

Quadro 5 - Materiais sólido extraídos após secagem em estufa em cada etapa da extração, com picos específicos não carotenoides / misturas (a, c, e, g) e com picos específicos de materiais carotenoides (b, d, f, h), utilizando como branco Álcool.





Fonte: Autores (2023).

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAROTENOIDES TOTAIS EXPRESSOS EM BIXINA POR ESPECTROFOTOMETRIA

5.4.1 Análise do teor de pigmentos dos materiais extraídos na extração proposta.

A tabela 6 fornece informações das absorbâncias e teor de carotenoides totais expresso em bixina a 453 nm. O cálculo foi realizado utilizando as equações 1, 2 e 3. O quadro 6 representa os gráficos com as amostras de comprimentos de onda em 453 nm, essenciais para determinação da absorbância no cálculo, como determina a norma.

Tabela 6 - Teor de bixina do material extraído

Material	Comprimento de onda (nm)	Absorbância (u.a)	Teor de Bixina (%)
3A	453	0,028	65,6
3B	453	0,019	96,6
4A	453	0,021	87,8
4B	453	0,020	92,7

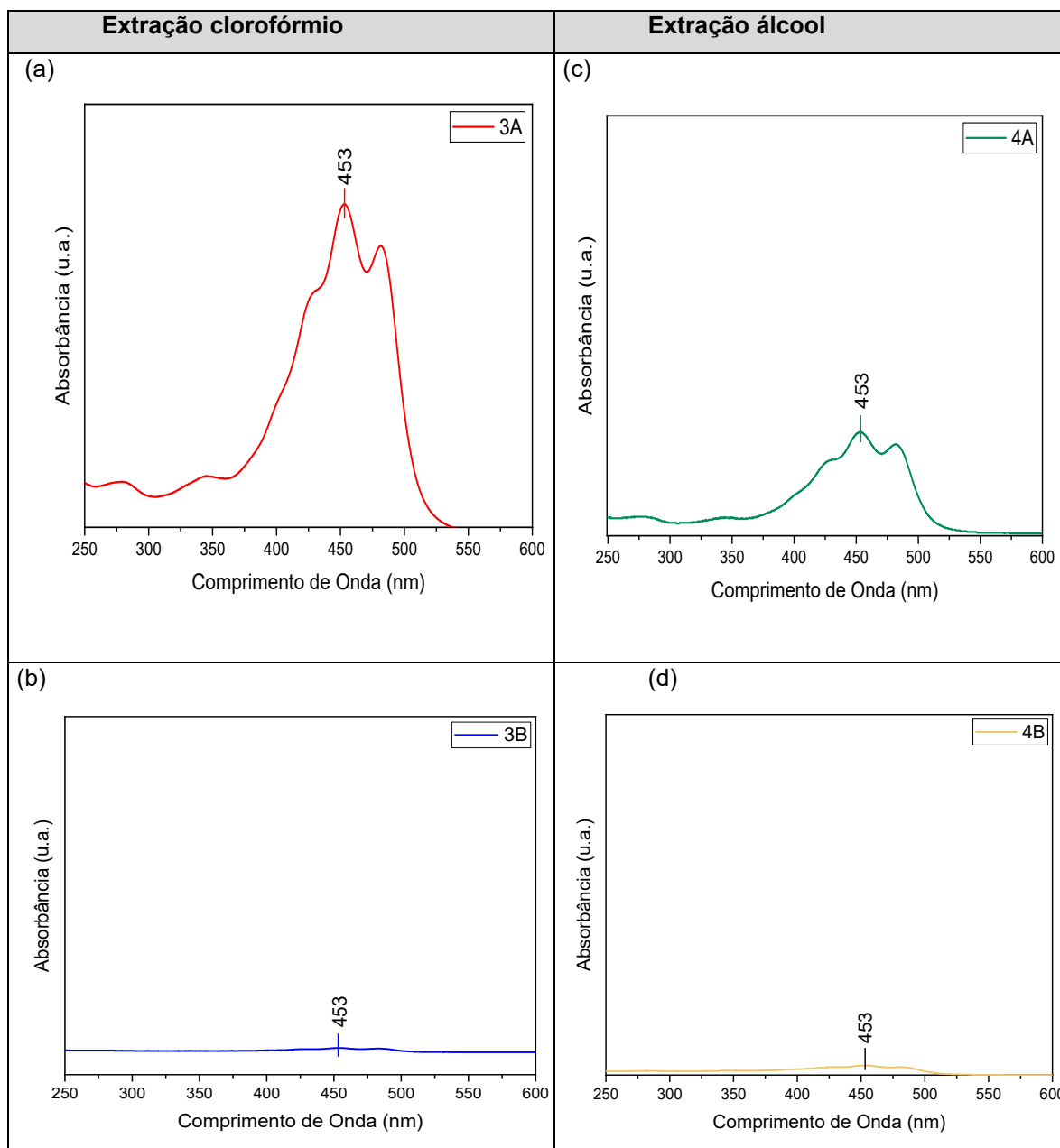
Fonte: Autor (2023).

Tomando como base o teor de bixina (%), nas amostras analisadas, foi observado que a etapa da extração realizada com clorofórmio (P.A) após a destilação (3B) e a etapa realizada com álcool etílico (P.A) após a destilação (4B) encontram-se na forma mais pura, valores que corroboram com os trabalhos realizados por Perotti *et al.*, (2020); Saini *et al.*, (2022) e Calogero *et al.*, (2015).

Os resultados dos teores de bixina (Tabela 6) ilustra a rota utilizada no processo. Os solventes utilizados na análise e sua recuperação provavelmente influenciaram nos valores encontrados ou até mesmo a proporção de compostos isômeros como relatado no trabalho de Enayti *et al.*, (2023) e Marcolino *et al.*, (2011).

Ao realizarem-se varreduras para identificar os pontos de máxima absorbância, em um mesmo comprimento de onda (453 nm), observou-se que quadro 6 (a b, c, d) apresentam picos diferentes de absorbância. Esses valores quantificados na tabela 6 de absorbâncias diferentes, influenciam diretamente no teor de bixina analisada, convergindo com os trabalhos de Marcolino *et al.*, (2011) e RAHMALIA *et al.*, (2018).

Quadro 6 - Espectro de absorção de bixina em hidróxido de potássio (KOH), com comprimento de onda em 453 nm: Extração clorofórmio após destilação (a); extração clorofórmio resíduo do balão volumétrico (b); Extração álcool antes da destilação (c); extração álcool pós a destilação (d).



Fonte: Autor (2023).

5.4.2 Análise do teor de pigmentos do material extraído segundo a norma.

O quadro 7 apresenta os valores de absorbâncias e teor de carotenoides totais expressos em bixina para cada lote de semente em cada etapa da extração. Como a norma estabelece que o material analisado precisa estar na forma de pó,

em algumas etapas da extração, em algumas etapas não foi possível a sua determinação (Nd), inviabilizando a sua análise. Outro detalhe da não determinação (Nd) do material extraído segundo a norma utilizada, foi o fato de alguns materiais apresentarem baixo rendimento. A norma estabelece que sejam utilizados 0,1 gramas do pó do material que se deseja analisar.

O quadro 7 ilustra que só foi possível a determinação dos teores de carotenoides totais expressos em bixina no lote da semente água / etapa clorofórmio; lote da semente hexano / etapa clorofórmio e álcool e lote da semente álcool / etapa álcool e clorofórmio.

Quadro 7 - Teor de bixina do material extraído

Lote/Solvente	Etapas/ Solvente	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Absorbância (u.a)	Teor de Bixina (%)
Álcool	Água	Nd	Nd	Nd
	Hexano	Nd	Nd	Nd
	Clorofórmio	453	0,023	79,5
	Álcool	Nd	Nd	Nd
Semente Hexano	Hexano	Nd	Nd	Nd
	Clorofórmio	453	0,022	83,5
	Álcool	453	0,025	73,5
	Água	Nd	Nd	Nd
Semente Clorofórmio	Clorofórmio	Nd	Nd	Nd
	Álcool	Nd	Nd	Nd
	Água	Nd	Nd	Nd
	Hexano	Nd	Nd	Nd
Semente Álcool Etílico	Álcool	453	0,03	61,2
	Água	Nd	Nd	Nd
	Hexano	Nd	Nd	Nd
	Clorofórmio	453	0,024	76,5

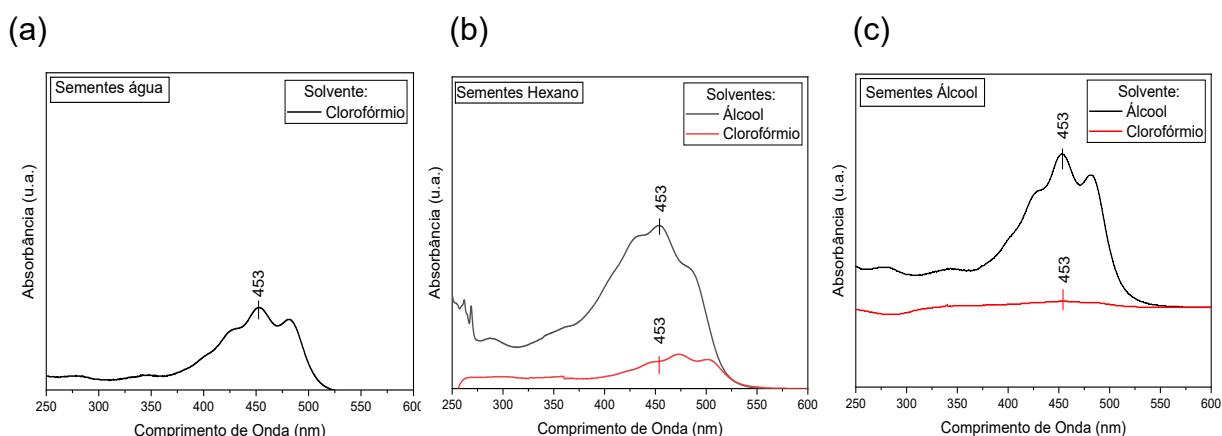
Fonte: Autor (2023).

Os teores diferentes de carotenoides totais expressos em bixina observados no quadro 7 indica a etapa utilizada no processo. Como o material extraído (bixina) foi obtido por meio de etapas em um sistema mecânico de rotação com alternância de solventes, é possível que parte da divergência entre os dados físico-químicos se deva a pequenas impurezas ocasionadas pelo uso do solvente, tais impurezas nem sempre são eliminadas o que pode causar variações na leituras durante a análise, como é demonstrado em estudos de quantificação conduzido por vários autores

(HUSA *et al.*, 2018; MCKEOWN e Marck 1962; SCOTTER, MICHAEL J., 1995; TAKAHASHI, M. Y., 1987)

O gráfico da Figura 17 (a), (b) e (c), apresentam picos de absorbâncias diferentes, em um mesmo comprimento de onda (453 nm), indicando os pontos de máxima absorbância em cada varredura. Esses resultados são semelhantes aos alcançados por (TAKAHASHI, M. Y., 1987 e HUSA *et al.*, 2018).

Figura 17 - Gráfico do Espectro de absorção de bixina em hidróxido de potássio (KOH) com comprimento de onda em 453 nm: Lote da semente Água/etapa água (a); Lote da semente Hexano/ etapa Álcool e Clorofórmio (b); Lote da semente Álcool/ etapa Álcool e Clorofórmio (c).



Fonte: Autor (2023).

5.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMETRICA DAS AMOSTRAS (TG e dTG)

As curvas de variação de massa versus temperatura (termogravimetrias) (TG) e dTG, foram obtidas para coletar informações sobre a estabilidade térmica dos materiais extraídos das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.).

Pode-se observar através da gráfico 18 (a) as curvas termogravimétricas sobrepostas do material extraído com água (amostra 1), Hexano (amostra 2), clorofórmio após a destilação (amostra 3A), clorofórmio resíduo do balão volumétrico (amostra 3B), álcool etílico antes da destilação (amostra 4 A) e álcool etílico após a destilação (amostra 4 B), e os estágios da degradação, observado no gráfico 18 (b), sua análise derivada da termogravimetria (dTG).

O material obtido da extração com água (amostra 1), possui três eventos principais (gráfico 18 (b)), caracterizados pela perda de massa do material. O

primeiro evento ocorre no intervalo de temperatura entre 25°C e 173°C, com 21,36% de perda de massa, além de estar relacionada a perda de água superficialmente adsorvida no material, existe também a possibilidade do material ter absorvido água e durante a análise ela vaporizar, haja visto que esse material se mostra bastante higroscópico, resultados semelhante ocorreram nos trabalhos de (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008).

O segundo evento ocorre entre 173°C a 593°C, com 42,55% de perda de massa, nesse faixa de temperatura observamos, uma perda de massa de forma mais acentuada, indicando a sua degradação. O terceiro evento ocorre na faixa de 593°C e 806°C com 24,46% de perda de massa do material até que ocorra a sua estabilização.

A única amostra líquida, foi a extraída com hexano, obteve-se uma fração oleosa. Para a sua análise utilizou-se nitrogênio (N₂) líquido, para que ocorresse a sua solidificação, possibilitando a sua realização. O material de característica oleosa (amostra 2), dentre todos os analisados é o único que degrada em uma única etapa (gráfico 18 (b)) em uma faixa de temperatura entre 25°C a 215°C.

Na etapa da extração na qual utilizou-se o solvente clorofórmio representados pelas amostras 3A e 3B e álcool representado pelas amostras 4A e 4B é característico do corante bixina. Silva *et al.*, (2005) detalha eventos de degradação muito semelhantes aos que foram encontrados nessa pesquisa, observamos 5 eventos de degradação térmica (gráfico 18 (b)).

O material adquirido da extração utilizando clorofórmio após a destilação (amostra 3 A) apresenta uma perda de massa entre as faixas de temperatura entre 25° a 100°C de 1,44%, como essas amostras foram secas em estufa a 50°C, nessa etapa da degradação, pode ter ocorrido a liberação de água de adsorção residual contida nas amostras. Entre 100°C e 237°C houve uma perda de 8,92% de material e entre 237°C e 307° a amostra perdeu uma massa de 10,08%.

As três primeiras perdas de massas foram muito baixas em relação a quarta e a quinta perda, o que provavelmente possa está ocorrendo entre o primeiro e o terceiro eventos a isomerização da bixina, ou seja, a cis-bixina (forma encontrada na natureza) se transforme em trans-bixina (forma estável) indicando que o grau de degradação é influenciado pela temperatura, esse estudo está condizente com os trabalhos de Silva *et al.*, (2005) e Stringheta *et al.*, (2018) ou ainda, em um estudo proposto por Takamoto (2015) e Bitencourt (2018) foi proposto que isso ocorre

devido ao polimorfismo de cada material extraído em cada etapa, ou ainda devido a proporção de isômeros cis trans ou dicis presentes em cada amostra. Além disso é importante destacar que a bixina por ser um produto orgânico natural, na presença do calor, luz ou do dióxido de enxofre, sofre degradação (SCOTTER, MICHAEL J., 1995).

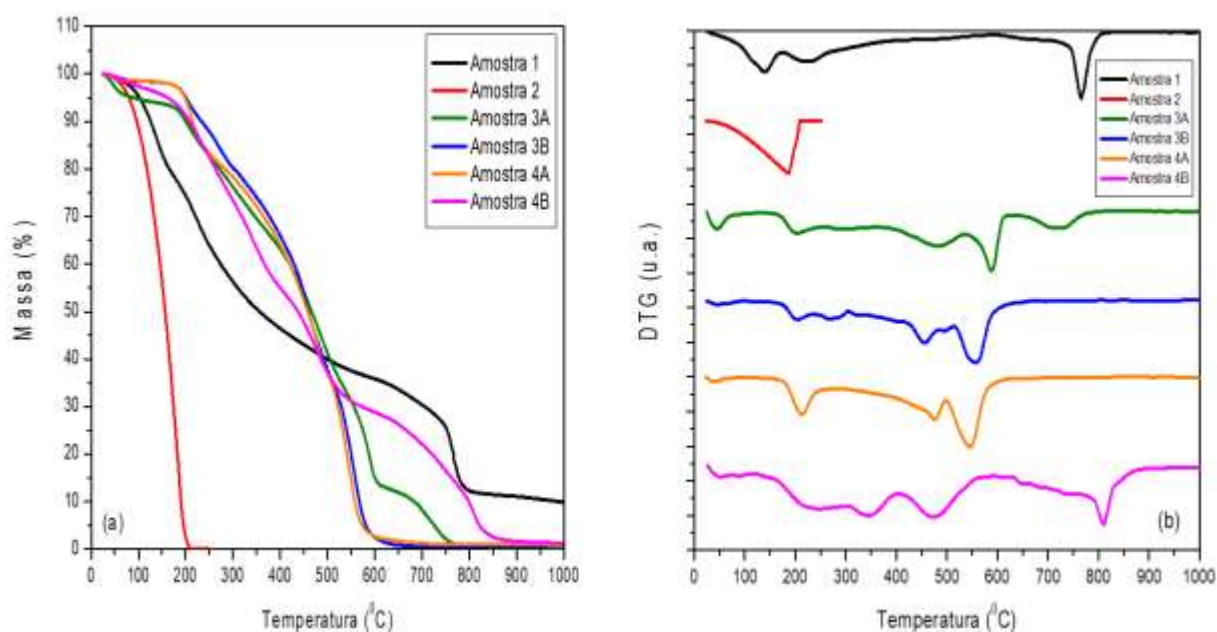
A degradação desses carotenoides ocorre com a decomposição de produtos coloridos variando do amarelo pálido ao laranja. O composto amarelo com 17 carbonos é o principal produto gerado na decomposição desse carotenoide, mas outros compostos de menor massa molecular como o m-xileno, traços de tolueno e ácido tolúico também são relatados (SCOTTER, M. J. *et al.*, 1994; SCOTTER, MICHAEL J., 1995; SCOTTER, MICHAEL J *et al.*, 2000; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). O quarto e quinto eventos, que ocorrem entre faixas de temperaturas de 307°C a 511°C (perda de 44,92% de massa) e 511°C e 670°C (perda de 33,90% de massa).

Analizando as curvas de dTG presentes no gráfico 4 (b), das amostras 3A e 3B do material extraído utilizando solvente clorofórmio, observa-se eventos de degradação relativamente próximos, o que nos remete a interpretar que nas duas amostras os materiais são os mesmos, ou seja, bixina e que ambas sofrem isomerização. Logo, entre 25°C e 110°C observa-se uma perda de massa 6,53%, na faixa de temperatura entre 110°C e 290°C ocorre uma perda de 29,26% de massa e a partir do terceiro evento as degradações são maiores. Entre 290°C e 490°C a perda de massa é em torno de 37,81%, entre 490°C e 600°C ocorre uma perda de 23,77% na massa, se estabilizando na faixa de variação de temperatura entre 490°C e 800°C com perda de 1,82% em sua massa.

Não muito diferente do observado nas amostras de bixina, extraídas com clorofórmio, observa-se quatro eventos de degradação do material extraído com álcool etílico (amostra 4A), muito provavelmente, por esse material não ter sido destilado, sobram resíduos do material da extração anterior. A primeira degradação (gráfico 18 (b)) ocorre na faixa de temperatura entre 25°C e 102°C com perda de 1,42% em massa, o segundo evento ocorre na faixa de temperatura entre 102°C e 278°C perdendo 18,23% da sua massa, nos eventos três e quatro ocorrem as maiores perdas de massas 42,81% e 36,45% em faixas de temperaturas entre 278°C e 498°C e 498°C até sua estabilização em 750°C respectivamente.

Para a amostra extraída após a destilação (amostra 4B), os eventos da degradação (gráfico 18 (b)) são quatro: entre as temperaturas de 25°C a 115°C ocorre uma perda de 3,17% de massa, a segunda perda de massa acontece entre as temperaturas de 115°C e 406°C, nesse caso de 42,56%, a maior perda de massa registrada, entre 406°C e 595°C é de 25,07%, se estabilizando entre as temperaturas de 595°C e 950°C com uma perda de 27,68% na massa do material.

Figura 18 - Gráfico (a) TG e (b) dTG dos compostos extraídos das sementes de urucum (*Bixa Orellana* L.)



Fonte: Autor (2023).

5.6 ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC), foi usada para auxiliar sobre os estudos da decomposição dos constituintes dos materiais extraídos e os eventos endotérmicos e/ ou exotérmicos que possam vir a ocorrer, por meio do monitoramento do fluxo de calor em função da temperatura.

O comportamento térmico da amostra 1 (Figura 19), indica que o material analisado possui um evento endotérmico na temperatura de 123°C. Sugere-se que esse seja o mesmo evento que ocorre na primeira etapa da perda de massa do material observado na curva de TG (Figura 19), pois o evento se encontra exatamente nessa faixa de temperatura, ou seja, relacionada a perda de água

superficialmente adsorvida no material, além da sua vaporização. Em seguida observa-se um processo contínuo exotérmico com um pico na faixa de temperatura entre 193°C, a partir daí ocorre uma degradação exotérmica do material.

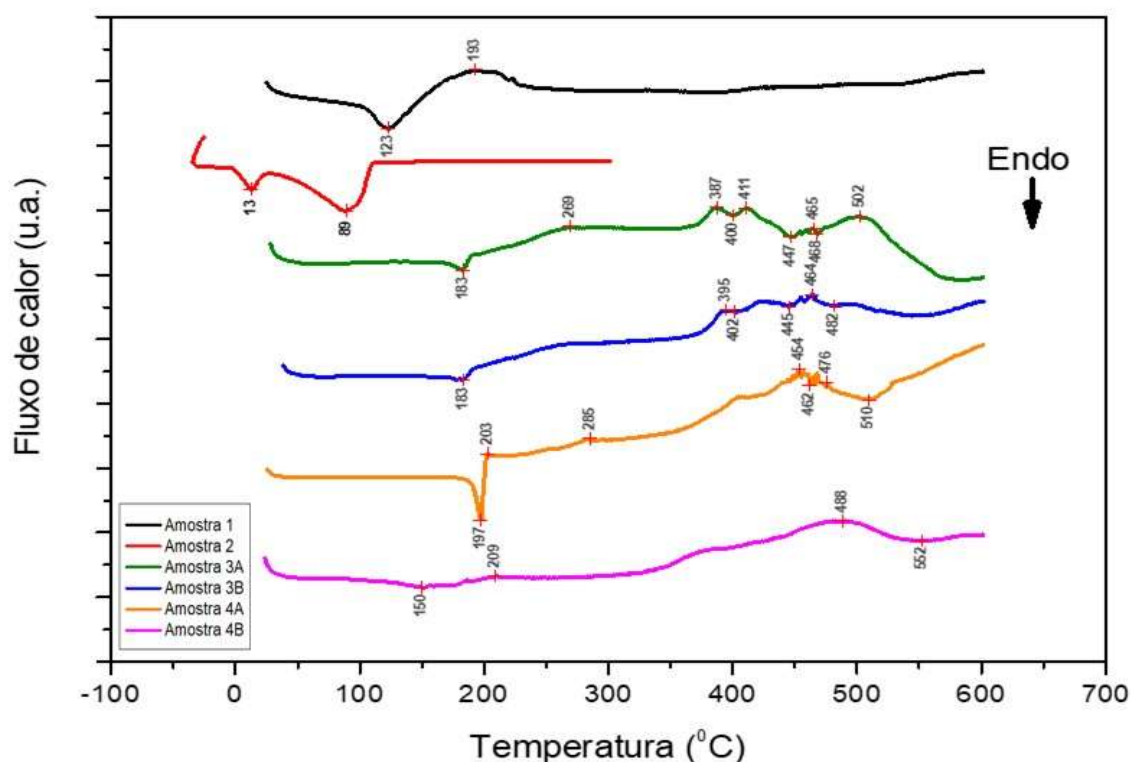
A curva de DSC da amostra 2 (Figura 19), possui dois eventos endotérmicos em faixas de temperaturas de 13°C e 89°C respectivamente. O primeiro evento ocorre em uma faixa de temperatura baixa o que pode indicar a vaporização de substâncias voláteis contidas no óleo. A segundo pico exibiu um acentuado evento endotérmico em 89°C e partir dele ocorre a degradação do material. Associando esse evento as curvas de TG e dTG (Figura 18) a degradação ocorre em uma única etapa, fato observado na curva de DSC.

Para as amostras de bixina (3A, 3B, 4A e 4B) (Figura 19), observa-se eventos endotérmicos e exotérmicos em temperaturas muito próximas. Resultado semelhante foi relatado por (BITENCOURT *et al.*, 2018; FIGUEIREDO-JUNIOR *et al.*, 2021; MARCOLINO *et al.*, 2011; SILVA, MARTA C.D. *et al.*, 2005).

Para as amostras 3A e 3B o evento endotérmico ocorre na temperatura de 183°C e para a amostra 4A acontece na temperatura de 197°C. Essa variação nos pontos de fusão, pode ter sido ocasionada pelo uso do solvente usado durante a extração (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018), também pode ter ocorrido durante a recuperação do material ou devido à presença de polimorfismos nos cristais, ou mesmo, por causa da proporção dos isômeros *cis-trans* presentes na amostra (BITENCOURT *et al.*, 2018).

Os gráficos de Tg e dTG (Figura 18) é possível interpretar que com o aumento da temperatura há a isomerização da forma instável da bixina (Cis-bixina) para a sua forma estável (trans-bixina) e a consequente quebra da molécula nas mesmas faixas de temperaturas e essas prováveis quebras ocorrem com liberação de compostos. Resultados semelhantes foram relatados por (SCOTTER, M. J. *et al.*, 1994; SCOTTER, MICHAEL J., 1995). Na amostra 4B (Figura 19) ocorrem eventos endotérmicos e exotérmicos pouco pronunciados. O material possui ponto de fusão de 150°C e após isso a molécula se degrada e se estabiliza em uma faixa de temperatura de aproximadamente 552°C. Esses achados corroboram com os espectros de FTIR (Figura 15) e os espectros UV/Vis (Figura 16) que indicam a ocorrência de isômeros sendo formados.

Figura 19 - Gráfico da Analise térmica por DSC dos compostos extraídos das sementes de urucum (*Bixa Orellana L.*)



Fonte: Autor (2023).

5.7 CINZAS

A Tabela 6, indica os teores (em %) de cinzas de urucum antes (*in natura*) (Figura 20) e depois da extração (tratada) (Figura 21). Como incineramos uma massa de 20,0 g e a literatura utiliza 5,0 g, é razoável que tenhamos um teor maior do que a literatura nos mostra, mas fazendo uma proporcionalidade obtemos um percentual de cinzas de 4,07% (*in natura*) e 2,97% (Tratada) valores próximo dos trabalhos de Taham *et al.*, (2015).

Figura 20 - Sementes de urucum in natura (A) e tratada (B)



Fonte: Autor (2023)

Figura 21 - Cinzas das Sementes de urucum in natura (A) e tratada (B)



Fonte: Autor (2023)

É importante observamos que o teor das cinzas após a extração do material é inferior quando comparado com as cinzas antes da extração, isso porque após a extração, ocorre uma redução de parte dos teores dos minerais como observados nas Tabela 7 pela análise de Fluorescência de Raios-X (FRX).

Tabela 6 - Análise de cinzas.

Sementes	Cinzas (g)	Teor de Cinzas (%)
Semente (<i>in natura</i>)	3,26	16,3
Semente (Tratada)	2,38	11,9

Fonte: Autor (2023)

5.8 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (FRX)

A Tabela 7 fornece informações sobre a composição inorgânica presente nas sementes de urucum antes e após a extração dos materiais, bem como as suas cinzas após a incineração.

A análise química qualitativa por espectrometria de Fluorescência de Raios-X das cinzas indica a presença dos elementos químicos majoritários, Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Fósforo (P).

A maior parte dos elementos químicos (Mg, Si, P, Mn, Fe e Zn) diminuíram a sua concentração depois que ocorreu todas as etapas da extração, é provável que a extração utilizando solventes tenha arrastado uma parte deles.

Uma outra parte de elementos químicos (S, Cl e Rb) aumentou a sua concentração após a extração o que pode nos levar a acreditar em alguma possível contaminação durante os ensaios. Com relação ao Cloro (Cl) acreditamos está coerente, pois na extração foi utilizado o solvente clorofórmio (CHCl_3), que na sua estrutura possui o elemento químico Cloro (Cl), logo uma parte as sementes devem ter absorvido.

A presença do Ca (Cálcio) nas cinzas das sementes de urucum antes da extração e a sua ausência após a extração nos leva a acreditar em algum erro instrumental, já que o K ($Z = 19$) e o Ca ($Z = 20$) são elementos químicos vizinhos na tabela periódica. Este fato pode provocar sobreposição de linhas espectrais dos elementos, em função das proximidades das energias de excitação dos elétrons, dificultando a análise, por isso o potássio (K) aparece com uma concentração de 80,34% e a de cálcio (Ca) não apresenta concentração. Este resultado está de acordo com o encontrado por Fernandes (2012).

Tabela 7 - Composição da parte inorgânica das Sementes de Urucum

Elementos	Semente (%) (In natural)	Cinza (%) Semente (In natural)	Semente (%) Tratada	Cinza (%) Semente Tratada
Mg	2,26	6,19	1,37	5,25
Al	3,33	-	2,10	-
Si	3,86	0,56	2,87	0,42
P	1,65	7,19	2,92	6,59
S	3,90	1,77	2,80	1,93
Cl	-	3,07	1,71	4,03
K	44,83	63,46	51,82	80,34
Ca	34,36	16,01	29,31	-
Ti	0,45	-	0,43	-
Mn	0,57	0,38	0,37	0,24

Fe	2,76	0,85	2,49	0,70
Cu	0,16	-	0,11	-
Zn	0,56	0,29	0,41	0,19
Rb	0,31	0,19	0,46	0,26
Sr	0,15	-	-	-
Sn	0,80	-	0,80	-

Fonte: Autor (2023).

Ferreira & Falesi (1989) examinaram os teores de nutrientes nas sementes, na casca e na placenta de seleções de urucuzeiro e concluíram que na semente os teores de nutrientes eram superiores aos da casca. A média dos teores encontrados na semente pelos autores nas 5 seleções de urucuzeiro foram fósforo 3,74 mg/g, potássio 19,2 mg/g, cálcio 1,82 mg/g, magnésio 2,22 mg/g, zinco 0,0354 mg/g, cobre 0,0046 mg/g, ferro 0,085 mg/g e manganês 0,023 mg/g.

Os minerais são elementos com funções orgânicas muito importantes no organismo pois participam tanto na forma iônica quanto constituintes de compostos (enzimas, hormônios e proteínas do tecido orgânico) e são nutrientes vitais, que compõe cerca de 4% do peso do corpo (CALIXTO-LIMA, [S.d.]).

Em um estudo publicado por Anselmo *et al.*, (2008), para cada 100g de semente de urucum existem 7 mg de cálcio. O cálcio (Ca) é um macromineral que possui várias importâncias fisiológicas, dentre elas, a formação e metabolismo do osso, mediação da contração vascular e vasodilatação, função muscular, transmissão nervosa, sinalização intracelular e secreção hormonal, além de ser o mineral mais abundante no organismo, constituindo cerca de 1,5 a 2% do peso corporal e 39% dos minerais do corpo humano (ZHU; ZHENG, 2020).

Além de promover o crescimento celular o potássio (K) tem funções biológicas importantes na transmissão neural, tônus vascular e contração muscular, é o principal cátion do fluido intracelular, está presente em pequenas quantidades no fluido extracelular. Juntamente com o sódio, o potássio está envolvido na manutenção do equilíbrio hídrico normal, equilíbrio osmótico e o equilíbrio ácido-base. Juntamente com o cálcio, ele é importante na regulação da atividade neuromuscular (FARQUHAR *et al.*, 2015; WEAVER; MARR, 2013). Segundo Ferreira

& Falesi, (1989), o potássio no farelo da semente do urucum possui valor de 19,2mg/g.

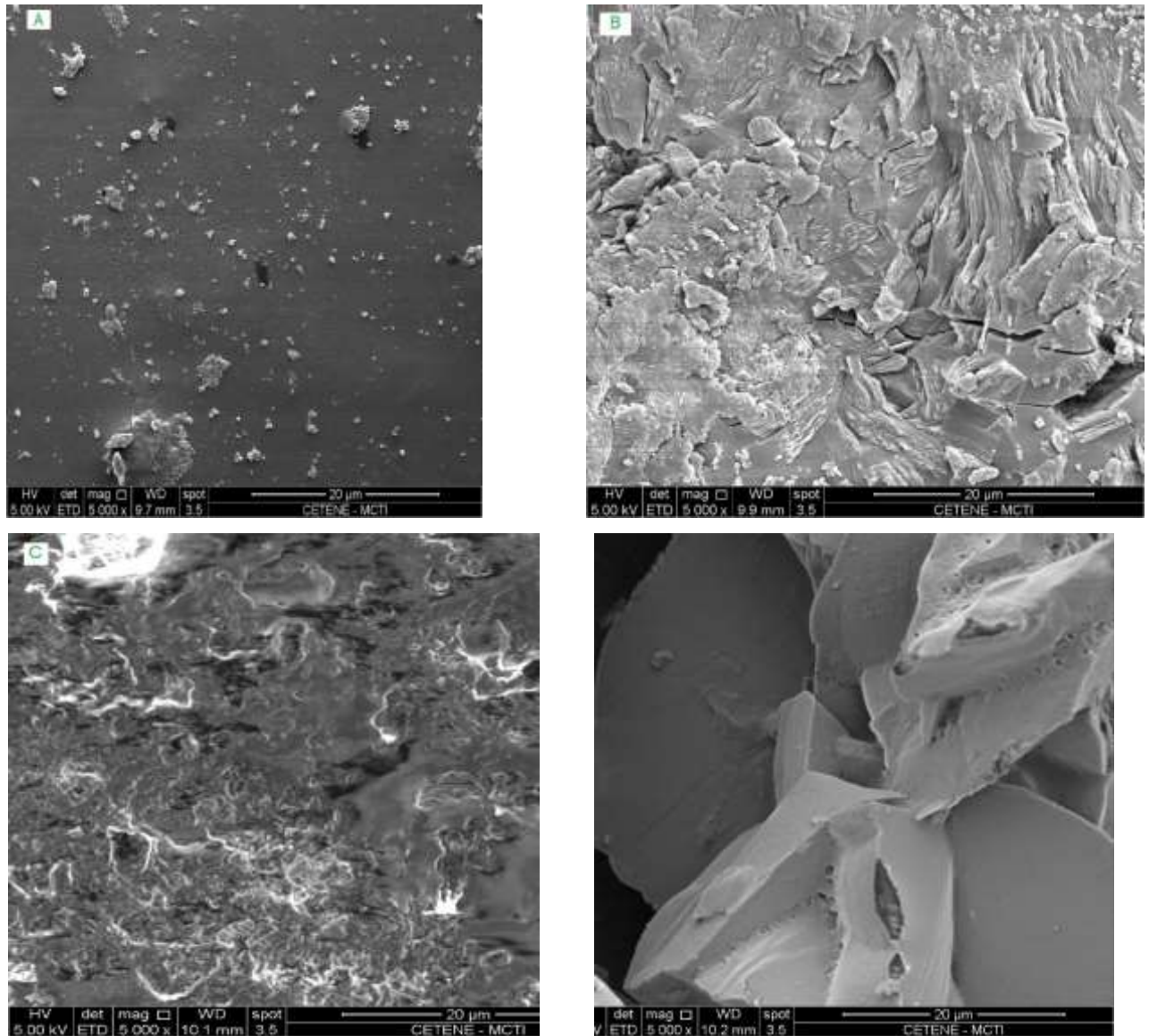
5.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)

As análises utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) realizadas para a bixina com magnificações em 5.000x são ilustradas sob a forma de micrografias conforme a Figura 17. A imagem A e B são os materiais extraídos com clorofórmio e a imagem C e D são os materiais extraídos com álcool antes e após a destilação respectivamente.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para caracterização qualitativa de elementos químicos presentes nas amostras e avaliar a morfologia da bixina (amostras 3A, 3B, 4A e 4B) extraídas das sementes de urucum. Não foi possível a análise da amostra extraída com água (amostra 1) pois houve uma interação com o aparelho, inviabilizando a caracterização.

Nas imagens da superfície da bixina é possível observar que o material apresenta irregularidades em toda a sua extensão, destacando-se a presença de agregados, sulcos e lamelas. Características essas relatadas também por Enayati *et al.*, (2023) segundo o qual, irregularidades são justificadas ao considerar que o estado de agregação da bixina durante a análise se encontra em forma de pó, esse aspecto aglomerado torna difícil a visualização individual da partícula. Segundo Rios e Mercadante (2004), supondo que diferentes maneiras de extração do carotenoide podem ser empregadas, diferenças morfológicas podem ocorrer, desta forma, não se pode fixar um padrão de imagem micrográfica para este material.

Figura 22 - MEV da bixina: ampliação de 5000x.



Fonte: Autor (2023).

A análise de Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) permitiu identificar de forma semi-quantitativa estes elementos, visto que não foi utilizado padrões para determinação. Os resultados EDS desse carotenoide, apresentaram os elementos químicos esperados (carbono e oxigênio) encontrado na estrutura da bixina.

6 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa foi realizada por meio de uma nova rota, extrair compostos bioativos presentes nas sementes de urucum. Foi utilizado uma sequência de etapas com diferentes solventes. A utilização de solventes polares e apolares possibilitou um bom rendimento e teor de extração, para o material extraído com clorofórmio (P.A) e álcool (P.A)

O espectro de infravermelho (FTIR) da bixina (amostra 3A, 3B, 4A e 4B) garantiu que nas etapas da extração com clorofórmio e álcool etílico ocorreu de forma satisfatória pois a avaliação dos espectros de infravermelho (FTIR), possibilitou verificar todas as bandas de absorções características do corante bixina, com discretos deslocamentos nos números de onda, devido a metodologia adotada na extração. Para as amostras 1 e 2 as bandas de absorção diferem do corante bixina.

O espectro de UV/Vis da bixina (amostra 3A, 3B, 4A e 4B) foram identificadas as três bandas de absorção na região visível características dos carotenoides, além de apresentar picos do ultravioleta (UV), ou seja, abaixo de 400 nm atribuídas à transição do estado fundamental para um estado excitado, que só é permitido nos isômeros cis dos carotenoides, corroborando com espectros de FTIR. Para as amostras 1 e 2A apesar dos estudos indicarem que não sejam carotenoides, são materiais isolados que provavelmente associados com outros filtros químicos, sejam importantes para a fotoproteção.

As curvas TG/dTG que avalia a estabilidade térmica da bixina, apresenta um perfil de perda de massa ocorrendo em quartos e cinco estágios de degradação, indicando a eliminação de produtos com diferentes massas, formados a partir da quebra das ligações duplas da cadeia carbônica dos carotenoides.

Nas curvas de DSC é possível observar picos endotérmicos e exotérmicos, os endotérmicos indicando pontos de fusão (183 °C, 197°C, 209°C) da bixina condizentes com a literatura e os picos exotérmicos indicam a decomposição térmica.

A análise de cinzas entre as sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) *in natura* e tratada, apresentou uma redução da parte inorgânica. É provável que durante o processo de extração, tenha ocorrido o arraste de minerais.

A Fluorescência de Raios-X (FRX) das sementes e das cinzas permitiu verificar a presença de elementos inorgânicos. Com exceção do cloro onde há um aumento em sua concentração se compararmos as sementes *in natura* com a semente tratada, pois utilizamos o solvente clorofórmio que contém o elemento químico cloro (Cl) aumentado a sua concentração, há uma redução esperada sobre a concentração de minerais, pois a extração arrastou a parte mineral da amostra analisada. Esses minerais são essenciais para o bom funcionamento do corpo humano.

A estrutura da bixina analisada pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) mostra uma morfologia com presença de agregados, sulcos e lamelas. A espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) revela os elementos químicos Carbono (C) e Hidrogênio (H) em sua estrutura.

A metodologia desenvolvida para extração de compostos bioativos foi satisfatória do ponto de vista dos produtos extraídos para uma possível aplicação.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Feito o processo de extração, sugerimos aplicações:

- ✓ Em processos de fotodegradação na superfície de nanopartículas semicondutoras de TiO_2 .

- ✓ Adição da bixina em filmes de PLA (poli(láctido)) após mistura por fusão ou fundição de solução para obtenção de novos materiais de embalagem para produtos alimentícios sensíveis à luz.

- ✓ A bixina foi testada formando um filme fino como um biosorvente para a remoção eficiente de mercúrio (Hg^{2+}) de diversos sistemas aquosos.

- ✓ Provavelmente o material extraído com água, associados a outros filtros químicos, sejam importantes para a fotoproteção.

REFERÊNCIAS

- AGNER, A. R. et al. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687–1693, 2004.
- AGUDELO PATIÑO, Tatiana et al. Potential for Sustainable Production of Natural **Colorants in the Tropical Forest: A Biorefinery Case of Annatto Seeds.** Sustainability (Switzerland), v. 15, n. 4, 2023.
- ALBUQUERQUE, Carolina L.C.; MEIRELES, M. Angela A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 86–95, 2012.
- ALCÁZAR-ALAY, Sylvia C. et al. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. **Food Research International**, v. 99, p. 393–402, 2017.
- ALWIS, D. D.D.H.; CHANDRIKA, U. G.; JAYAWEERA, P. M. Photostability of apocarotenoids on surface of TiO₂ semiconductor nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 407, n. December 2020, p. 2–8, 2021.
- ANSELMO, George Carlos dos Santos; MATA, Mário Eduardo R. M. Cavalcanti; RODRIGUES, Edson. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (Bixa Orellana L). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1888–1892, 2008.
- BALAKRISHNAN, M. et al. Microencapsulation of bixin pigment by spray drying: **Evaluation of characteristics.** Lwt, v. 145, n. March, 2021.
- BAPTISTÃO, Mariana. **Caracterização elementar e de compostos orgânicos em sementes de urucum** : um estudo multi plataforma Caracterização elementar e de compostos orgânicos em sementes de urucum : um estudo multi plataforma. p. 1–99, 2020.
- BARROZO, M. A.S.; SANTOS, K. G.; CUNHA, F. G. Mechanical extraction of natural dye extract from Bixa orellana seeds in spouted bed. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 279–282, 2013.
- BHATT, Takshma; PATEL, Kirtan. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 10, n. 3, p. 109–117, 2020.
- BITENCOURT, Antônio P.R. et al. Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (Bixa orellana L.) extract using an organic solvent-free and low energy method. **Food Chemistry**, v. 257, n. May 2017, p. 196–205, 2018.
- BRUNNER, Gerd. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

BURRI, B. J. Carotenoids: Chemistry, Sources and Physiology. **Encyclopedia of Human Nutrition**, v. 1–4, p. 283–291, 2012.

CALIXTO-LIMA, Larissa. **Exames Laboratoriais Aplicados à Nutrição Clínica**. [S.l: s.n.], [S.d.].

CALOGERO, Giuseppe et al. Vegetable-based dye-sensitized solar cells. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 10, p. 3244–3294, 2015.

CARVALHO, I. C. et al. TiO₂-based dye-sensitized solar cells prepared with bixin and norbixin natural dyes: Effect of 2,2'-bipyridine additive on the current and voltage. **Optik**, v. 218, n. July, 2020.

CARVALHO, Paulo Roberto Nogueira *et al.* **Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do instituto agrônômico (IAC)**. *Bragantia*, v. 69, n. 3, p. 519–524, 2010.

CASTRO, W. F.; MARIUTTI, L. R.B.; BRAGAGNOLO, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 126–131, 2011.

CELLS, Solar et al. *Quim. Nova*, v. 38, n. 10, p. 1357–1365, 2015.

CHAO, ROY R. et al. 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.

CHISTÉ, Renan Campos; MERCADANTE, Adriana Zerlotti; et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

CHISTÉ, Renan Campos; YAMASHITA, Fábio; et al. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 57–63, 2011.

COELHO DOS SANTOS, Daniela et al. *Bixa orellana* L. (Achiote, Annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 287, n. September 2021, 2022.

COLOSIMO, Débora Freitas *et al.* Development, modeling and simulation of extraction and purification of bixin from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 182, p. 478–489, 2022.

CONDÉ VIEIRA, Júlia *et al.* Bixin as a new class of biosorbent for Hg²⁺ removal from aqueous solutions. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 15, n. August 2020, 2021.

COSTA, C. K. *et al.* Identificação de δ tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (*Bixa orellana* Linné). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4,

p. 508–512, 2013.

COSTA, Paulo Afonso Da et al. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603–1606, 2010.

COSTELLO, Rebecca; WALLACE, Taylor C.; ROSANOFF, Andrea. **Magnesium. Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 199–201, 2016.

DA SILVA JÚNIOR, Raimundo Miguel et al. Development and characterization of thin film composite developed from poly (vinyl alcohol) (PVA)/polyethylene glycol (PEG)/norbixin (NBx)/hydroxyapatite. **Colloid and Polymer Science**, v. 299, n. 5, p. 751–762, 2021.

DA SILVA SANTOS, Éverton *et al.* Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 252–260, 2016.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, Raimundo Gonçalves et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, n. February, p. 549–561, 2019a.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, Raimundo Gonçalves et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, n. November 2018, p. 549–561, 2019b.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability**. [S.l: s.n.], 2010. v. 40.

DO NASCIMENTO, Luciano F.; DOS SANTOS, Elisabete P.; DE AGUIAR, Alcino P. Organic sunscreens. Research, innovation and the organic synthesis importance. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 190–223, 2014.

DOS SANTOS, Ana Elisa Antunes et al. Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract: Preparation, characterization, and in vivo evaluation for potential wound healing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 118, p. 111322, 2021.

ENAYATI, Ayesheh et al. Bixin-loaded colloidal nanodelivery systems, techniques and applications. **Food Chemistry**, v. 412, n. September 2022, p. 135479, 2023.

FABRI, Eliane Gomes; TERAMOTO, Juliana Rolim Salomé. Urucum: Fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 1, 2015.

FABRI, Gomes; ROBERTO, Paulo; CARVALHO, Nogueira. 1 ; 2 ; 3 ; 4. p. 1–10, 2012.

FARIA, Daniele Vidal et al. Irradiance and light quality affect two annatto (*Bixa orellana* L.) cultivars with contrasting bixin production. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, n. April, 2019.

FARQUHAR, William B. et al. Dietary sodium and health: More than just blood pressure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 10, p. 1042–1050, 2015.

FERREIRA, Waldemar de Almeida; FALESI, Italo Claudio. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO FRUTO E TEOR DE BIXINA EM URUCU (*Bixa orellana* L). **Boletim de Pesquisa Número 97** - Embrapa, p. 31, 1989.

FIGUEIREDO-JUNIOR, Alexsandro Tavares et al. Bixin loaded on polymeric nanoparticles: synthesis, characterization, and antioxidant applications in a biological system. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 11, n. 1, p. 63–78, 2021.

FRANÇA, Bruna Karoline et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

GALINDO-CUSPINERA, Veronica; RANKIN, Scott A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2524–2529, 2005.

GASPARIN, Alexia Thamara et al. Bixin attenuates mechanical allodynia, anxious and depressive-like behaviors associated with experimental diabetes counteracting oxidative stress and glycated hemoglobin. **Brain Research**, v. 1767, n. January, 2021.

GIMÉNEZ-MASCARELL, Paula et al. Novel aspects of renal magnesium homeostasis. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. April, 2018.

GIRIWONO, Puspo E. et al. Dietary supplementation with geranylgeraniol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of nuclear factor- κ B activation in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 1191–1199, 2013.

GIULIANO, Giovanni; ROSATI, Carlo; BRAMLEY, Peter M. To dye or not to dye: Biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513–516, 2003.

GÓMEZ-ORTÍZ, N. M. et al. Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 94, n. 1, p. 40–44, 2010.

GONZÁLEZ, Salvador; FERNÁNDEZ-LORENTE, Manuel; GILABERTE-CALZADA, Yolanda. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614–626, 2008.

GUINAZ, Michele *et al.* Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2098–2103, 2009.

HIENDRO, Ayong *et al.* Enhanced performance of bixin sensitized TiO₂ solar cells with activated kaolinite. 2012 International Conference on Enabling Science and **Nanotechnology, ESciNano 2012 - Proceedings**, v. 92, n. 8, p. 11–12, 2012.

HO, Hsin Jung *et al.* A novel function of geranylgeraniol in regulating testosterone production. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 6, p. 956–962, 2018.

HOUNSOME, N. *et al.* Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 48–65, 2008.

HUSA, N. N.; HAMZAH, F.; SAID, H. M. Characterization and Storage Stability Study of Bixin Extracted from Bixa orellana Using Organic Solvent. IOP Conference Series: **Materials Science and Engineering**, v. 358, n. 1, 2018.

IBRAHIM SILVA, Pollyanna; NACHTIGALL, Aline Manke; STRINGHETA, Paulo Cesar. Eficiência de solventes na obtenção e caracterização de corantes de urucum (bixa orellana L.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 115–124, 2010.

JĄSKIEWICZ, Anna *et al.* Diverse action of selected statins on skeletal muscle cells—an attempt to explain the protective effect of geranylgeraniol (GGOH) in statin-associated myopathy (SAM). **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, 2019.

KANG, E. J. *et al.* Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 3891–3901, 2010.

KAPOOR, Leepica; RAMAMOORTHY, Siva. Strategies to meet the global demand for natural food colorant bixin: A multidisciplinary approach. **Journal of Biotechnology**, v. 338, n. March, p. 40–51, 2021.

KARMAKAR, Utpal Kumar *et al.* Antioxidant, analgesic, antimicrobial, and anthelmintic activity of the dried seeds of Bixa orellana (L). **International Journal of Pharmacy (Hyderabad, India)**, v. 8, n. 1, p. 150–163, 2018.

KATURU, Rajasekhar *et al.* Mevalonate depletion mediates the suppressive impact of geranylgeraniol on murine B16 melanoma cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 5, p. 604–613, 2011.

KIOKIAS, Sotirios; GORDON, Michael H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 523–529, 2003.

LAKEY-BEITIA, Johant *et al.* Carotenoids as novel therapeutic molecules against neurodegenerative disorders: Chemistry and molecular docking analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 1–22, 2019.

LEE, I-Min *et al.* **Vitamin E in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease**

and Cancer. *Jama*, v. 294, n. 1, p. 56, 2005.

LLOYD, A. G. Extraction and chemistry of cochineal. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 91–107, 1980.

LÓPEZ ORTÍZ, C. M.; PRATS MOYA, Maria S.; BERENGUER NAVARRO, V. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2–3, p. 141–149, 2006.

LU, Shan; LI, Li. Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation, and beyond. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 778–785, 2008.

MA, Jie Qiong *et al.* Bixin attenuates carbon tetrachloride induced oxidative stress, inflammation and fibrosis in kidney by regulating the Nrf2/TLR4/MyD88 and PPAR- γ /TGF- β 1/Smad3 pathway. *International Immunopharmacology*, v. 90, n. September, p. 107117, 2021.

MARCOLINO, Vanessa Aparecida *et al.* Interaction of curcumin and bixin with β -cyclodextrin: Complexation methods, stability, and applications in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 3348–3357, 2011.

MELOI, Priscilla Siqueira *et al.* Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088–1093, 2011.

MENNA-BARRETO, R. F.S. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi activity of Pterodon pubescens seed oil: Geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 111–117, 2008.

MIYAZAWA, Teruo; NAKAGAWA, Kiyotaka; SOOKWONG, Phumon. Health benefits of vitamin E in grains, cereals and green vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 12, p. 651–654, 2011.

MOHAMAD, Nur Vaizura; IMA-NIRWANA, Soelaiman; CHIN, Kok Yong. Therapeutic potential of annatto tocotrienol with self-emulsifying drug delivery system in a rat model of postmenopausal bone loss. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 137, n. December 2020, 2021.

MONTE, Samylla Miranda *et al.* Genotoxicity Evaluation of Polystyrene Membrane with Collagen and Norbixin by Micronucleus Test and Comet Assay. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 5, n. 4, p. 7–11, 2016.

MORAES, Moyses N.; ZABOT, Giovani L.; MEIRELES, M. Angela A. Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 262–271, 2015.

NOBRE, B. P. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from bixa orellana seeds (experiments and modeling). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 251–258, 2006.

PACHECO, Samanta Daliana Golin *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Bixin, a Carotenoid Extracted from the Seeds of *Bixa orellana*. **Planta Medica**, v. 85, n. 16, p. 1216–1224, 2019.

PACHECO, SDG *et al.* Antioxidant and Effects of Processing Using Bixin Potassium Salt As. **Visão acadêmica**, v. 19, p. 4–23, 2018.

PEREIRA, Ana Lúcia Fernandes; VIDAL, Tatiana Fontoura; CONSTANT, Patrícia Beltrão Lessa. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 34, n. 3, p. 231–247, 2009.

PEREIRA, Wanderson S. *et al.* Anti-arthritis properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1078–1091, 2018.

PEROTTI, Gustavo F. *et al.* Intercalation of apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana* L.) into layered double hydroxides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 11, p. 2211–2223, 2020.

PIERPAOLI, Elisa *et al.* Effect of annatto-tocotrienols supplementation on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1352–1360, 2013.

RAHMALIA, Winda *et al.* Adsorption Characteristics of Bixin on Acid-and Alkali-Treated Kaolinite in Aprotic Solvents. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2018, 2018.

RAHMALIA, Winda *et al.* Aprotic solvents effect on the UV-visible absorption spectra of bixin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 131, p. 455–460, 2014.

RAHMALIA, Winda; FABRE, Jean-François; MOULOUNGUI, Zéphirin. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 455–464, 2015.

RAHMAN, Shakilur *et al.* Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, n. 3, p. 195–205, 2008.

RAO, Madipatla Prathyusha *et al.* Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection - Preparation, characterisation and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 485–492, 2014.

RIOS, Alessandro De O.; BORSARELLI, Claudio D.; MERCADANTE, Adriana Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2307–2311, 2005.

RIVERA-MADRID, Renata *et al.* Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*) seeds: Synthesis and health promoting properties. **Frontiers in Plant Science**, v. 7,

n. September, p. 1–7, 2016.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, Manuel; STANGE, Claudia. Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 110–116, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.07.009>>.

RODRIGUEZ, Delia. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. [S.l: s.n.], 2001. RUIZ-ANCHONDO, Teresita; FLORES-HOLGUÍN, Norma; GLOSSMAN-MITNIK, Daniel. **Natural carotenoids as nanomaterial precursors for molecular photovoltaics**: A computational DFT study. *Molecules*, v. 15, n. 7, p. 4490–4510, 2010.

SAINI, Ramesh Kumar *et al.* Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, 2022.

SCHWARTZ, Heidi *et al.* Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 2, p. 152–161, 2008.

SCOTTER, M. J. *et al.* Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 3, p. 301–315, 1994.

SCOTTER, Michael J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 177–185, 1995.

SCOTTER, Michael J *et al.* Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food Coloring Formulations . 2 . Determination of Aromatic Hydrocarbon Thermal Degradation Products by Gas Chromatography. p. 484–488, 2000.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, Luqman J.; MOHAMMAD, Faeer. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016.

SHAMI, Najua Juma Ismail Esh; MOREIRA, Emilia Addison Machado. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.

SHIBATA, Akira *et al.* Tumor anti-angiogenic effect and mechanism of action of δ -tocotrienol. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 3, p. 330–339, 2008.

SHOKUNBI, Olutayo Sunday *et al.* Potassium, sodium, calcium and magnesium levels of commonly consumed foods and estimates of dietary intakes of selected Nigerian adults. **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.

SHUMSKAYA, Maria; WURTZEL, Eleanore T. The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions. **Plant Science**, v. 208, p. 58–63, 2013.

SIEFERMANN-HARMS, Dorothes. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. **BBA Reviews On Bioenergetics**, v. 811, n. 4, p. 325–355, 1985.

SILVA, G. F. et al. Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 419–426, 2008.

SILVA, Marta C.D. et al. Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (*bixa orellana* L.). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 2, p. 277–281, 2005.

SILVA, PI. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**, 2007.

GARCIA, S. V.; ALVES, P. e S.; DIAS, L. S.; SANTOS, L. J. C.; LUSTOSA, S. M. C.; VIANA, D. S. F.; VIANA, V. G. F. . Synthesis and determination of the Sun Protection Factor of a cosmetic gel-cream based on norbixin. In: Seven Publicações. (Org.). **Global Saúde Tendências e Perspectivas em Saúde Ciências**. 1. ed. São José dos Pinhais: Seven Publicações, 2023, v. , p. 69-.

SINHA, Keka et al. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 165–171, 2013.

STOLL, Liana *et al.* Bixin, a performing natural antioxidant in active food packaging for the protection of oxidation sensitive food. *Lwt*, v. 180, n. September 2022, 2023.

STRINGHETA, Paulo C; SILVA, Pollyanna I; COSTA, G V. Annatto / Urucum — *Bixa orellana*. p. 23–30, 2018.

SUN, Yongye et al. Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. **Nutrition Research**, v. 32, n. 5, p. 328–334, 2012.

TAHAM, Thiago; CABRAL, Fernando A.; BARROZO, Marcos A.S. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 175–183, 2015.

TAHAM, Thiago; SILVA, Danylo Oliveira; BARROZO, Marcos A.S. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 313–321, 2016.

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade**. 2. ed., Sao Paulo, 1987. 114 p.
TAY-AGBOZO, Sefadzi. Characterization of the carotenoid cis-bixin. **Nuevos sistemas de comunicación e información**, p. 1–152, 2018.

TAYA, Sofyan A. *et al.* Dye-sensitized solar cells based on dyes extracted from dried

plant leaves. **Turkish Journal of Physics**, v. 39, n. 1, p. 24–30, 2015.

TOCCHINI, Luciane; MERCADANTE, Adriana Zerlotti. Extração E Determinação, Por Clae, De Bixina E Norbixina Em Coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, 2001.

TRACTZ, G. T. et al. Study of TiO₂ hybrid solar cells with natural dyes. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, p. 1074–1086, 2018.

VAN CHUYEN, Hoang; HOI, Nguyen Thi Ngoc; EUN, Jong Bang. Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of different extraction methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1333–1338, 2012.

VARDANEGA, Renata et al. Selective extraction of bioactive compounds from annatto seeds by sequential supercritical CO₂ process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 122–127, 2019.

VERSHININ, Alexander. **Biological functions of carotenoids - Diversity and evolution**. **BioFactors**, v. 10, n. 2–3, p. 99–104, 1999.

VILAR, Daniela De Araújo et al. Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa Orellana L.: A review. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VOLKOVOVA, Katarina et al. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 11, n. SUPPL.1, p. 1–13, 2012.

WALTER, Michael H.; STRACK, Dieter. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 663–692, 2011.

WANG, Steven Q. et al. Comparison of ultraviolet A light protection standards in the United States and European Union through in vitro measurements of commercially available sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 1, p. 42–47, 2017.

WEAVER, Connie; MARR, Elizabeth T. White vegetables: A forgotten source of nutrients: Purdue roundtable executive summary. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, 2013.

YOLMEH, Mahmoud; HABIBI NAJAFI, Mohammad B.; FARHOOSH, Reza. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319–324, 2014.

ZABOT, Giovani L. et al. Physicochemical, morphological, thermal and pasting properties of a novel native starch obtained from annatto seeds. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. August 2018, p. 321–329, 2019.

ZABOT, Giovani L.; MORAES, Moyses N.; MEIRELES, M. A.A. Process integration

for producing tocotrienols-rich oil and bixin-rich extract from annatto seeds: A technoeconomic approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 122–138, 2018.

ZHU, Xiaowei; ZHENG, Houfeng. **Factors in influencing peak bone mass gain**. 2020.