

**AVALIAÇÃO DOS TEORES DE GERANILGERANIOL EM DIFERENTES ACESSOS
DE URUCUM. EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
GERANILGERANIOL EXTRAÍDOS DE SEMENTES DE URUCUM.**

FLÁVIA ANGARTEN LUIZ DA SILVA¹; MARTA GOMES DA SILVA²; ELIANE GOMES
FABRI³; PAULO ROBERTO NOGUEIRA CARVALHO⁴

Nº 11253

RESUMO

As sementes de urucum são muito conhecidas na indústria alimentícia por apresentarem em sua composição o carotenóide bixina, muito utilizado como corante natural. Entretanto as sementes vêm adquirindo notoriedade por apresentarem também em sua composição outras substâncias, como o geranilgeraniol, que podem se responsáveis por várias das propriedades farmacológicas atribuídas ao urucum, como antiinflamatório, expectorante, febrífugo, entre outros. Todavia, é desconhecida a variação da concentração do geranilgeraniol nas variedades de urucum e como extraí-las e separá-las. Esse estudo propõe avaliar as concentrações de geranilgeraniol, bixina e lipídios em sementes de urucum, dos acessos presentes no Pólo Regional Centro Norte, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, em Pindorama, SP. e estabelecer uma tecnologia para a extração e separação do geranilgeraniol. Esse artigo apresenta os resultados das análises de geranilgeraniol, bixina e lipídios dos acessos da coleção, em sementes coletadas na safra do ano de 2010. Os resultados indicaram concentrações de bixina entre $1,78 \pm 0,01$ g/100g a $3,12 \pm 0,03$ g/100g de sementes; concentrações de lipídios de $1,45 \pm 0,05$ g/100g a $3,33 \pm 0,03$ g/100g de sementes e concentrações de geranilgeraniol de $0,52 \pm 0,07$ g/100g a $1,38 \pm 0,22$ g/100g de sementes. Observou-se também uma correlação positiva significativa ($P = 5\%$) entre os teores de lipídios e de geranilgeraniol nas amostras estudadas. O estudo inicial de extração e separação do geranilgeraniol das sementes de urucum indicou que o aproveitamento de um subproduto (material insaponificável) da extração do corante de urucum com solventes alcalinos apresenta-se como uma excelente alternativa para a obtenção do geranilgeraniol e que é possível a separação do geranilgeraniol desse subproduto pelo processo de destilação fracionada à vácuo (destilador de filme fino).

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Química - UNICAMP, Campinas-SP, flavinha_angarten@yahoo.com.br;

² Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP, martags@ital.sp.gov.br

³ Pesquisadora, IAC, Campinas-SP, efabri@iac.sp.gov.br

⁴ Orientador/Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, carvalho@ital.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

Com as restrições impostas ao uso de aditivos sintéticos nos alimentos industrializados cresceu a procura por meios de se obter corantes naturais que possam ser usados no ramo alimentício (CARVALHO *et al*, 2005). Entre essas fontes de corantes, os pigmentos obtidos do urucum tiveram grande importância, sendo atualmente o pigmento natural mais utilizado em alimentos e o Brasil o maior produtor mundial dessas sementes (CUSTÓDIO *et al*, 2002).

As pesquisas realizadas com o urucum demonstraram que ele pode conter substâncias de interesse farmacológico, sendo citado seu uso como antiinflamatório, antimalárico, cardiotônico, digestivo, estomáquico, expectorante, febrífugo, hipotensivo, laxativo, em tratamento de queimadura, repelente de inseto e no combate a tosse (BARBOSA FILHO, 2006). Todas essas funções fizeram com que fossem realizados estudos buscando identificar a presença de outras substâncias, além dos pigmentos carotenóides, que pudessem apresentar as propriedades farmacológicas, tradicionalmente atribuídas ao urucum. Muitos desses estudos têm apontado para a presença de geranilgeraniol como parcialmente responsável por essas propriedades. Contudo, muito pouco se sabe sobre a variação da concentração dessas substâncias nas diferentes variedades de urucum e como extraí-las e separá-las das sementes.

Esse estudo procura avaliar a concentração de geranilgeraniol em diferentes acessos de urucum, utilizando a coleção existente no Pólo Regional Centro Norte, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, em Pindorama, SP e estabelecer uma tecnologia para a extração e separação do geranilgeraniol.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Matéria-prima

As sementes de urucum utilizadas nesse estudo foram provenientes do banco de germoplasma instalado no Pólo Regional Centro Norte da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, no município de Pindorama, SP. As cachopas das plantas selecionadas foram amostradas e encaminhadas ao Instituto Agronômico em Campinas, SP sob os cuidados da pesquisadora Eliane Gomes Fabri. Nos laboratórios da Seção de Horticultura do IAC, as cachopas foram secas e as sementes foram separadas manualmente. Parte das sementes foram embaladas em sacos de papel e encaminhadas para os laboratórios do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos - Itai. Nos laboratórios do Itai as

sementes foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração até o momento das análises.

Métodos

Métodos analíticos

Umidade

A determinação de umidade foi feita com base no método descrito da AOAC (HORVITZ, 2006), que tem como princípio a determinação indireta da água presente nas amostras por gravimetria. A água é eliminada por aquecimento em estufa e a massa do resíduo seco é determinada. A umidade é calculada pela diferença entre as massas das amostras antes e após a secagem.

Lipídios

A determinação de lipídios foi conduzida com base no método descrito pela AOAC (HORVITZ, 2006), que tem como princípio a extração de substâncias solúveis em éter de petróleo a quente.

Cinco gramas da amostra de sementes de urucum foram adicionadas em um cartucho de papel de filtro qualitativo. O cartucho foi colocado em um extrator de Butt que foi conectado a um balão de fundo redondo, previamente tarado, contendo 80 mL de hexano (30 – 70°C) e a um condensador de bolas. O solvente foi aquecido e o refluxo foi mantido por um período de 8 horas. Após esse período o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, à vácuo, com uma temperatura entre 60 a 65°C. O resíduo de solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. O balão contendo o material extraído, livre do solvente, foi aquecido em estufa a 100°C \pm 5°C por 1 hora. Após esse período o balão foi resfriado em dessecador, até a temperatura ambiente e pesado. O teor de lipídios foi calculado pela diferença entre a massa inicial do balão e a massa do balão com o material extraído.

Bixina

O método analítico para a determinação de bixina baseia-se na saponificação da bixina em “sal de norbixina” com “solução sabão”, diluição em solução de hidróxido de potássio e quantificação espectrofotométrica, conforme descrito por CARVALHO *et al.* (2010).

Geranilgeraniol

O método analítico utilizado foi baseado na metodologia descrita por ZAHN *et al* (2000), que tem como princípio a extração da amostra com hexano, purificação pela partição entre solventes e análise cromatográfica. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna C18 (250 mm x 4 mm, partículas de 5 μ m) e fase móvel composta por metanol:acetato de amônio 50 mM (90:10, v/v) com uma vazão de 1,0ml/min. A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos e a identificação feita por comparação com o tempo de retenção do padrão analítico e pelos espectros obtidos pelo sistema de detecção (arranjo de diodos).

A metodologia analítica para geranilgeraniol foi previamente validada⁵ quanto a seletividade/especificidade, a linearidade, a sensibilidade (limite de detecção e quantificação) e a precisão do sistema cromatográfico e do método analítico. A incerteza total e expandida do método analítico foi calculada com base no resultados do processo de validação. Foram consideradas as incertezas relativas aos equipamentos e vidrarias utilizados e da metodologia validada.

Separação do geranilgeraniol

A tecnologia desenvolvida para a separação do geranilgeraniol das sementes de urucum buscou preservar o processo de obtenção do corante. Para isso optou-se pelo processo de extração dos pigmentos das sementes de urucum com solventes alcalinos, cujo processo foi descrito por CARVALHO (2010).

Neste processo de produção do corante hidrossolúvel de urucum (sal de norbixina) as sementes de urucum são extraídas em contracorrente com solução aquosa de NaOH ou KOH em concentrações que variam de 5% a 2% (m/v). A mistura é agitada por um período de aproximadamente 30 minutos e transferida para uma peneira para a separação dos grãos. O extrato é encaminhado para um tanque de recepção e as sementes retornam para novo processo de extração. Os extratos contidos no tanque de recepção são aquecidos para a conversão completa da bixina em sal de norbixina. Após resfriamento o extrato é filtrado e encaminhado para um tanque para padronização e envase. Esse processo apresenta como subproduto uma mistura de substâncias que contém um material formado por substâncias insaponificáveis, incluindo o geranilgeraniol.

⁵ As demais metodologias não foram validadas por serem métodos oficiais ou já terem sido validadas nas referências apresentadas.

A separação de geranilgeraniol foi realizada com a utilização de um processo de destilação a baixas pressões, simulando o que deverá ocorrer na utilização industrial de um evaporador de filme fino. Para tanto foi utilizado um evaporador rotativo a vácuo, Marca Büchi, modelo EL 130. A água de refrigeração do condensador foi mantida a aproximadamente 10°C por um sistema de circulação de água, marca Varian, modelo 4.100. O balão coletor foi substituído por um sistema de coleta de destilado que permitia a medida do volume condensado. Para o aquecimento do balão com a amostra foi utilizada uma manta, marca Fisaton, Modelo 52 (200W) e a temperatura foi medida com um termômetro infravermelho Marca Icel, modelo TD-961. A pressão foi diminuída com o auxílio de uma bomba marca Primar, modelo 141.

Com a bomba utilizada foi possível obter um vácuo de aproximadamente 40cm de Hg, que foi mantido durante todo o processo de destilação. A temperatura de evaporação foi elevada gradativamente até aproximadamente 300°C, sendo mantido nessa temperatura por 140 minutos. O material evaporado foi constantemente coletado e analisado. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método analítico

O método não é específico, mas apresentou boa seletividade para o geranilgeraniol em sementes de urucum. O Tempo de retenção do geranilgeraniol (14 minutos) ofereceu uma boa separação de possíveis interferentes analíticos.

O método apresentou boa linearidade quando se trabalha com concentrações entre 0,5 e 3,1 µg/ml. A avaliação da linearidade resultou em um valor de $t = 115,45$ para geranilgeraniol. O t (*student*) tabelado para $n-2$ com 95% de probabilidade é 2,78, portanto a correlação foi considerada como significativa para a faixa avaliada.

Os cálculos da sensibilidade do método indicaram que o limite de detecção do método é 0,07 µg/ml e o limite de quantificação é 0,09 µg/ml. Valores muito inferiores ao esperado nos estudos das sementes e do óleo de urucum. Portanto o método apresentou sensibilidade suficiente para o que se propõe.

Os coeficientes de variação ($CV = 2,6\%$) foram inferiores ao estabelecidos pela equação de HORWITZ, 1982 ($CV = 3\%$), portanto o sistema cromatográfico e o método analítico apresentaram precisão adequada para a análise proposta.

O método apresentou exatidão adequada com 95% de confiança. Considerando as incertezas dos equipamentos e vidrarias utilizados no processo analítico e da

metodologia validada, a incerteza expandida foi de 0,21 mg/100g para uma concentração de geranilgeraniol igual a 3,5 mg/100g e um coeficiente de expansividade (k) igual a 2. Isso representa uma incerteza expandida de 12% (k=2).

Resultados de bixina, lipídios e geranilgeraniol dos acessos da coleção.

Os resultados das análises de bixina nas sementes de urucum apresentaram concentrações (base seca) variando de um mínimo de $1,78 \pm 0,01$ g/100g (acesso 21) a um máximo de $3,12 \pm 0,03$ g/100g (acesso 37). Esses valores são inferiores à avaliação feita pelos nossos laboratórios para amostras dessa mesma coleção, obtidas na safra do ano de 2007 (CARVALHO *et al*, 2010). Naquela oportunidade a concentração de bixina das amostras variaram de $3,12 \pm 0,06$ g/100g a $6,26 \pm 0,06$ g/100g. A mudança da coleção com o replantio de vários acessos e a inserção de novas plantas, cujas amostras representam a primeira colheita, deve ter influenciado nos valores encontrados nesse estudo.

Os resultados da concentração de lipídios das amostras variaram de $1,45 \pm 0,05$ g/100g (acesso 38) a $3,33 \pm 0,03$ g/100g (acesso 8). Esses resultados foram similares aos observados pelos nossos laboratórios para amostras dessa mesma coleção, obtidas na safra do ano de 2007 (CARVALHO *et al*, 2010). Naquela oportunidade a concentração de lipídios das amostras variaram de $1,97 \pm 0$ g/100g a $3,98 \pm 0,09$ g/100g.

A concentração de geranilgeraniol das amostras estudadas variou de $0,52 \pm 0,07$ g/100g (acesso 38) a $1,38 \pm 0,22$ g/100g (acesso 9). Esses valores indicam uma influência importante da variedade da planta sobre a concentração de geranilgeraniol das sementes. Observou-se também uma correlação positiva significativa ($P = 5\%$) entre os teores de lipídios e de geranilgeraniol nas amostras estudadas. Sementes com maiores teores de lipídios apresentaram também maiores concentrações de geranilgeraniol.

O teor de umidade das amostras variaram de $6,06 \pm 1,10$ g/100g a $8,67 \pm 0,01$ g/100g.

Separação do geranilgeraniol

Para os trabalhos de separação de geranilgeraniol foi utilizado um óleo obtido em um processo industrial de extração do corante das sementes de urucum com solução de KOH. A caracterização desse óleo indicou a seguinte composição: Umidade (g/100g) = $9,98 \pm 0,05$; Carotenóides totais expresso como bixina (g/100g) =

$0,64 \pm 0,01$; Extrato etéreo (g/100g) = $96,7 \pm 0,8$; Geranilgeraniol (g/100g) = $33,2 \pm 3,6$; pH = 9,7.

A Figura 1 apresenta o cromatograma da análise de geranilgeraniol do “óleo” residual antes e após o processo de separação por destilação e os cromatogramas obtidos com frações coletadas por um período de 140 minutos de destilação. Observou-se quase todo o geranilgeraniol presente na amostra original foi eliminado no processo de destilação.

Durante a destilação observou-se que em temperatura inferior a 200°C não houve arraste de geranilgeraniol. A partir de 275°C (30 minutos de destilação) iniciou o arraste de geranilgeraniol. A concentração máxima de geranilgeraniol foi obtida com uma temperatura de 295°C, após 60 minutos de destilação. A partir de 90 minutos de destilação houve uma diminuição da concentração de geranilgeraniol no destilado. Após 140 minutos de destilação todo o geranilgeraniol foi eliminado do “óleo” residual.

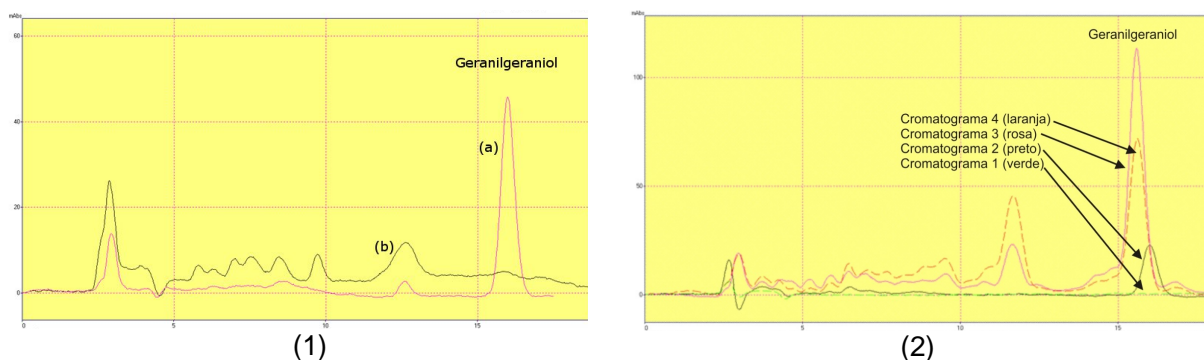


FIGURA 1. (1) = cromatograma do “óleo” residual antes (a) e após (b) o processo de destilação. (2) = cromatogramas obtidos com a destilação do “óleo” residual da extração de corante de urucum com soluções alcalinas. Cromatograma 1 = 20 minutos de destilação – Temperatura = 200°C; Cromatograma 2 = 30 minutos de destilação – Temperatura = 275°C; Cromatograma 3 = 60 minutos de destilação – Temperatura = 295°C; Cromatograma 4 = 90 minutos de destilação – Temperatura = 295°C. As demais condições de processo e analítica estão descritas nesse artigo.

CONCLUSÃO

A metodologia estabelecida para a análise de geranilgeraniol apresentou linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão adequadas para os ensaios propostos. As variedades das plantas apresentaram influência nos teores de geranilgeraniol das sementes. Houve uma correlação positiva entre a concentração de geranilgeraniol e lipídios das sementes de urucum. É possível a separação do geranilgeraniol pelo

processo de destilação fracionada à vácuo (destilador de filme fino) a partir do subproduto, identificado como “óleo” residual (material insaponificável), do processo de extração do corante de urucum com solventes alcalinos;

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pela bolsa de iniciação tecnológica.

Ao CCQA – ITAL, pelo estágio concendido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA FILHO, J. M. Bixa orellana: Retrospectiva de uso popular, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. **Anais do Simpósio Brasileiro de Urucum**, João Pessoa, PB, (Mídia eletrônica-CD), 2006.
- CARVALHO, P. R. N.; DA SILVA, M. G.; FABRI, E. G.; TAVARES, P. E. R.; MARTINS, A. L. M.; SPATTI, L. R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônomo (IAC). **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 519 – 524, 2010.
- CARVALHO, J.F.R.P.; ROBINSON, I.P.; ALFENAS, A.C. Isozymic variability in a Brazilian collection of annatto (*Bixa orellana* L.). **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 653-660, 2005.
- CUSTÓDIO, C.C.; MACHADO-NETO, N.B.; CASEIRO, R.F.; IKEDA, M.; BOMFIM, D.C. Germinação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 197-202, 2002.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemists*, v. 54, n. 1, p. 67A – 76A, 1982.
- HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current through Revision 1, 2006.
- ZAHN, T. J.; EILERS, M.; GUO, Z.; KSEBATI, M. B.; SIMON, M.; SCHOLTEN J. D.; SMITH, S. O.; GIBBS, R. A. Evaluation of Isoprenoid Conformation in Solution and in the Active Site of Protein-Farnesyl Transferase Using Carbon-13 Labeling in Conjunction with Solution- and Solid-State NMR. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 122, n. 30, p. 7153 – 7164, Aug. 2000.