



AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE METANOL EM CORANTES DE URUCUM (*Bixa Orellana* L.)

Leticia Oliveira **Frabetti**¹; Paulo Roberto Nogueira **Carvalho**²; Marta Gomes da **Silva**³; Fernanda Moralez Leme **Gomes**⁴; Enieluce dos Santos **Brito**⁵

Nº 20223

RESUMO – O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de sementes e corantes de urucum. Além da produção do colorífico, um condimento muito utilizado na culinária brasileira, os corantes do urucum são utilizados pela indústria de alimentos em produtos como salsichas, queijos e massas. A maior parte desses corantes é obtida por uma tecnologia que utiliza a extração com soluções alcalinas que, em alguns processos, promove a desesterificação da bixina resultando como produto, um sal de norbixina que, por sua solubilidade, tem sido bastante utilizado pelas indústrias de alimentos. Contudo, existe a possibilidade de formação de metanol durante o processo de desesterificação da bixina. Para testar essa hipótese esse projeto propôs o estabelecimento e a validação de um método para a análise de metanol em corantes de urucum. O método proposto, baseado na determinação por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama demonstrou ser seletivo, sensível, preciso e exato para a análise de metanol em corantes de urucum.

Palavras-chaves: Urucum (*Bixa Orellana* L.), metanol, CG-FID, headspace, validação.

¹ Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Processos Químicos, Fatec, Campinas-SP; leticiafrabetti@gmail.com.br

² Co-orientador: Pesquisador Científico do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Itai, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador Científico do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Itai, Campinas-SP.

⁴ Colaborador: Técnico de Pesquisa Tecnológica do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Itai, Campinas-SP.

⁵ Orientador: Assistente de Pesquisa Tecnológica do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Itai, Campinas-SP; eni@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT – *Brazil stands out as the world's largest producer of annatto seeds and dyes. In addition to the production of colorify, a condiment widely used in Brazilian cuisine, annatto dyes are used by the food industry in products such as sausages, cheese and pasta. Most of these dyes are obtained by a technology that uses extraction with alkaline solutions that, in some processes, promotes the de-esterification of bixin resulting in a product, a norbixin salt that, due to its solubility, has been widely used by the food industries. However, there is a possibility of methanol formation during the de-esterification process of bixin. To test this hypothesis, this project proposed the establishment and validation of a method for the analysis of methanol in annatto dyes. The proposed method, based on gas chromatography determination with flame ionization detection, proved to be selective, sensitive, precise and accurate for the analysis of methanol in annatto dyes.*

Keywords: Annatto (*Bixa Orellana L.*), methanol, CG-FID, headspace, validation.

1 INTRODUÇÃO

Este estudo faz parte de um conjunto de projetos que tem como finalidade estabelecer tecnologias para a separação e caracterização de um grupo de substâncias com atividades fitoterápicas, presentes no material insaponificável do óleo de urucum. Entre essas substâncias destacam-se o geranilgeraniol e os tocotrienóis fitoterápicos já conhecidos e comercializados a partir de sementes de urucum e a fração de cor azul, objeto de um desses estudos. Para isso, as atividades necessárias para o conhecimento dos produtos e processos imprescindíveis para o estabelecimento dessa tecnologia foram divididas em projetos, onde cada um contempla a obtenção de informações importantes para o que foi proposto. A Figura 1 indica os projetos que participam desses estudos (em destaque, em azul, a contribuição do presente projeto).

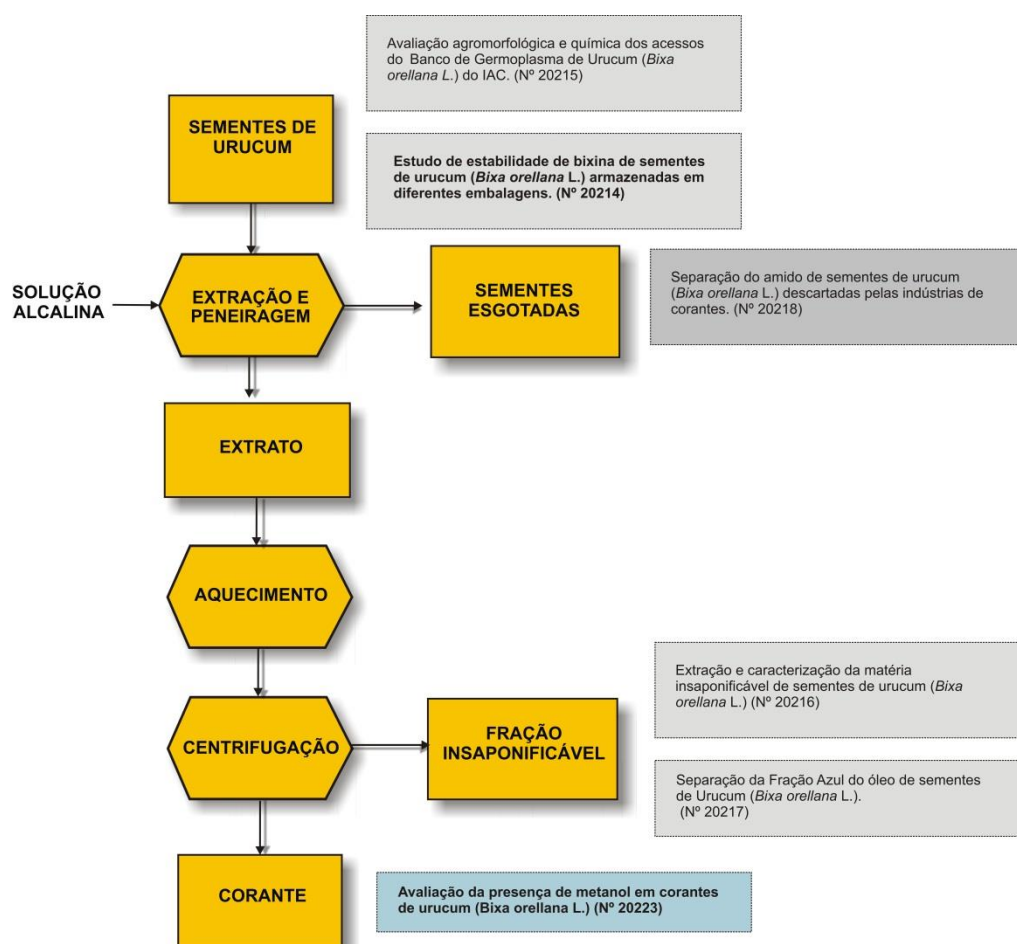


Figura 1. Localização da contribuição dos diferentes estudos no processo de separação da Fração Azul do óleo de urucum. Trabalhos apresentados no 14º Congresso de Iniciação Científica (CIIC 2020).



Entre esses projetos destacam-se: a) o conhecimento da variação de características importantes das sementes de urucum, buscando avaliar a concentração de pigmentos e lipídios de 63 acessos de urucum da coleção do IAC, localizado em Pindorama - SP e de sementes de plantações já consolidadas da região de Dracena - SP, considerada a região de maior produção dessa cultura do Estado de São Paulo [**Avaliação agromorfológica e química dos acessos do banco de germoplasma de urucum (*Bixa orellana* L.) do IAC**]; b) a avaliação da estabilidade dos pigmentos das sementes de urucum armazenadas sob vácuo, que procurou avaliar a diferença de estabilidade dos pigmentos do urucum armazenadas em embalagens tradicionais (rafia) e em embalagens com barreira a luz, oxigênio e vapor de água [**Estudo de estabilidade de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) armazenadas em diferentes embalagens**]; c) o estudo sobre o aproveitamento das sementes descartadas pela indústria de corantes, que buscou agregar valor à produção de corante e à separação de fitoterápicos dessa cultura [**Separação do amido de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) descartadas pelas indústrias de corantes**]; d) o estudo da concentração da fração insaponificável presente nas sementes de urucum [**Extração e caracterização da matéria insaponificável de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**]. e) o estabelecimento das condições para a separação da fração de coloração azul, cuja hipótese é a presença, na fração insaponificável do óleo de urucum, de derivados do azuleno, um importante anti-inflamatório de origem natural [**Separação da fração azul do óleo de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**]; f) a avaliação da presença de metanol em corantes produzidos pela tecnologia de extração de corantes que contempla a separação da fração insaponificável [**Avaliação da presença de metanol em corantes de urucum (*Bixa orellana* L.)**]

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de sementes e corantes de urucum. Em 2017 essa produção foi de 13.363 toneladas (IBGE, 2018) com um aumento de 4% na produção de sementes em relação ao ano de 2016 (12.817 toneladas). Das sementes do urucum se extrai o corante natural mais utilizado pelas indústrias alimentícias, esse corante pode ser encontrado na pigmentação de salsichas, massas, queijos, sorvetes, molhos, iogurtes, temperos, etc (Carvalho, 2018).

A extração dos pigmentos das sementes do urucum geralmente é feita através do uso de soluções alcalinas (KOH ou NaOH). Esse processo promove a desesterificação da bixina tendo como resultado o sal da norbixina, um pigmento solúvel em soluções aquosas alcalinas. Esse processo é importante porque promove a separação do material insaponificável e que é a matéria-prima para a separação de fitoterápicos presentes nas sementes de urucum. Contudo, durante esse processo pode ocorrer a formação do metanol como resultado da reação do radical metila,

resultante da reação de desesterificação, com o íon hidroxila oriundo da base utilizada na reação (Figura 2).

O metanol como uma substância química isolada, apresenta toxicidade, no entanto, ele é encontrado em frutas cítricas, tomate e seus derivados, aspartame e quando ingerido é metabolizado naturalmente pelo organismo (Brasil, 2006). Segundo a ANVISA a concentração máxima de resíduos de metanol nos alimentos prontos para o consumo não deve passar de 10 mg/kg (Brasil, 2007). De acordo com FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2006 a concentração máxima residual de metanol no corante norbixina extraído com solventes orgânicos como acetona, metanol, hexano, etanol, etc. com concentração maior ou igual a 85% é de 50 mg/kg. A FAO/WHO não estabelece limites para a concentração de metanol para corantes de urucum extraídos com soluções alcalinas.

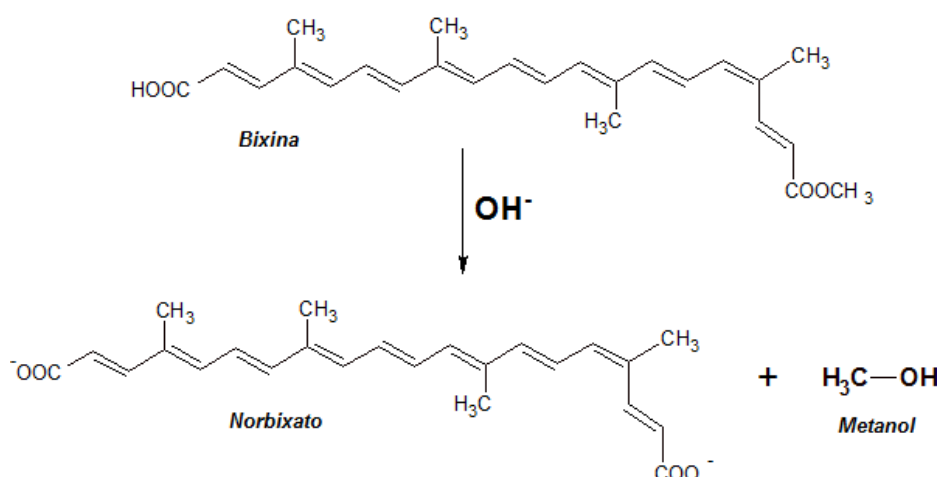


Figura 2. Reação de formação de metanol durante a extração de pigmentos do urucum com soluções alcalinas.

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais importantes e é considerada a principal técnica para separação e determinação de compostos voláteis. Seu poder de resolução permite a determinação de diversos compostos em matrizes com alta complexidade, tendo uma elevada sensibilidade. Essa técnica pode ser aplicada em amostras gasosas, líquidas ou sólidas, desde que os analitos sejam voláteis ou possam ser volatilizados sem sofrer decomposição (Penteado, 2008).

Esse projeto teve como objetivo a validação de uma metodologia para a determinação de metanol em corantes de urucum utilizando a cromatografia em fase gasosa e a determinação desse álcool em corantes de urucum.



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

2.1.1 Corante natural de urucum hidrossolúvel pó

Para a validação da metodologia utilizou-se uma amostra de corante de urucum em pó, com concentração superior a 30%, obtido pelo processo de extração com solução alcalina. Para o estudo, aproximadamente 5 g do corante foi solubilizado em 1 L de solução 0,5% de KOH. A análise do teor de sal de norbixina foi realizada utilizando a metodologia descrita por Carvalho *et al.*, (2010).

2.1.2 Corante preparado a partir de sementes de urucum

Os pigmentos foram obtidos a partir de uma amostra de aproximadamente 500 g de sementes de urucum solubilizada em 1L de solução 3% de KOH. As sementes foram separadas com o auxílio de uma peneira e a solução foi filtrada em papel de filtro e analisada quanto a concentração de sal de norbixina, utilizando a metodologia descrita por Carvalho *et al.*, (2010).

2.2 Método analítico

Para a avaliação da presença de metanol em corantes de urucum foi adaptado o método desenvolvido para quantificação de hexano residual, segundo Firestone (2017), usando a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID), combinada à técnica de *headspace*.

Os pontos das curvas padrão e das amostras de corantes de urucum (0,062 mL; 0,125 mL; 0,250 mL; 0,500 mL e 1,00 mL) foram preparados em *vials* com tampas de rosca e septos para vedação. Os *vials* contendo as amostras foram deixados em banho-maria a 80°C por 1h hora com agitação. Após o aquecimento, cada vial foi retirado e enrolado em uma flanela para manutenção da temperatura e 1mL de amostra foi retirado do *headspace* com a seringa gás-tight, aquecida em estufa a 60°C, e a amostra foi injetada no cromatógrafo. As condições cromatográficas foram as seguintes: cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama marca Varian 3900; coluna Agilent HP Innowax 60 m x 0,25 mm, 0,25 µm; temperatura da coluna: 80°C; volume de injeção: 1,0 mL; temperatura injetor: 140°C; temperatura detector: 250°C; programação térmica do forno: rampa 1- início 80°C com rampa de aquecimento até 160°C (10°C/ min), rampa 2 - início 160°C com rampa de aquecimento até 200°C (20°C/ min); fluxo da fase móvel (H₂:N₂:gás sintético): 1,0 mL/min. Foi utilizado 2-butanol como padrão interno para a quantificação do metanol.

2.3 Validação da metodologia analítica

Para a validação da metodologia foram considerados os seguintes parâmetros:

a) **Seletividade:** a seletividade foi avaliada pela injeção de uma amostra composta pela solução extratora do corante, considerada a matriz, e de uma amostra do padrão analítico. A ausência de substâncias nos tempos de retenção do metanol e do padrão interno na matriz foi estabelecida como seletividade do método. A seletividade foi completada com a injeção de uma amostra de corante de urucum e a confirmação do metanol no tempo de retenção do padrão, com o auxílio de um detector de espectrometria de massas; b) **Sensibilidade:** a sensibilidade do método foi determinada pela construção de curvas de calibração com a adição de metanol em concentrações que variaram de 0,062mL a 1,00mL. Foi considerado como limite de detecção e o limite de quantificação foi calculado utilizando os três menores pontos observados na curva de calibração, utilizando as Equações 1 e 2 (Quattrocchi *et al.*, 1992); c) **Precisão:** a precisão foi determinada por cinco repetições analíticas. Para a precisão ser considerada satisfatória o coeficiente de variação das repetições analíticas não deve ser maior que o obtido pela equação de Horwitz (1982) (Equação 3); d) **Exatidão:** a exatidão do método foi calculada a partir de cinco ensaios de recuperações analíticas na amostra em três níveis de concentração. Para a avaliação da exatidão foi utilizada a Equação 4, onde o valor de *t* (*student*) calculado deve ser superior ao valor de "*t*" tabelado ($p < 0,05$) com *n*-1 graus de liberdade.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: Y_{bl} , Coeficiente linear médio da regressão linear obtida pelos três menores pontos da curva de calibração; S_{bl} , estimativa de desvio médio da regressão linear obtida pelos três menores pontos da curva de calibração; b , coeficiente angular da curva analítica; n , número de replicatas.

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: C , concentração estudada expressa como potência de 10 (ex. 1mg/1000g (ppm) = 10^{-6} , $CV = 2^4 = 16\%$).

$$t_{cal} = \frac{|X - \bar{X}|}{s} \sqrt{n} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: t_{cal} , *t-student* calculado; X , corresponde a 100%; \bar{X} , recuperação média; s , estimativa de desvio padrão das recuperações; n , número de medidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização das amostras de corantes de urucum (análise de sal de norbixina)

A Tabela 1 apresenta a análise de carotenoides totais expressos como sal de norbixina, nas amostras de corantes utilizadas na validação da metodologia analítica.

Tabela 1: Resultados da análise de carotenoides totais expressos como sal de norbixina nas amostras de corantes utilizadas na validação da metodologia analítica.

Amostras	Resultado Sal de Norbixina (g/100g)
Corante de urucum em pó	35,88 (0,29) ^a
Corante de urucum extraído de semente com KOH	3,14 (0,04) ^a

^a média e estimativa de desvio padrão de no mínimo análises em duplicatas simultâneas e independentes.

3.2 Resultados da validação do método

3.2.1 Seletividade

A Figura 3 apresenta cromatogramas com a injeção da matriz e dos padrões analíticos (metanol e 2-butanol – padrão interno). A ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos padrões utilizados indicou que o método apresenta seletividade para o analito estudado. A seletividade foi completada com a confirmação da presença do metanol por detecção por espectrometria de massas (CG-MS) no tempo de retenção do padrão analítico em uma amostra de um corante de urucum extraído de sementes com soluções alcalinas, sem a adição do padrão (Figura 4).

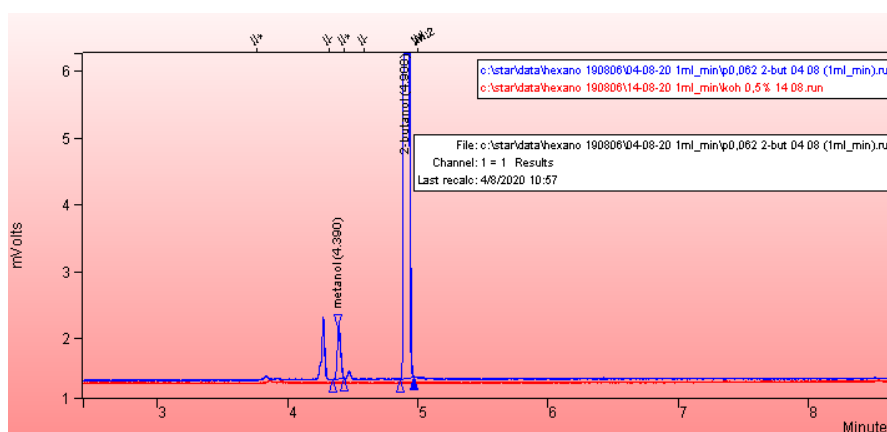


Figura 3. Cromatogramas com a injeção da matriz e da matriz com os padrões analíticos (metanol e 2-butanol – padrão interno).

A ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos padrões utilizados indicou que o método apresenta seletividade para o analito estudado.

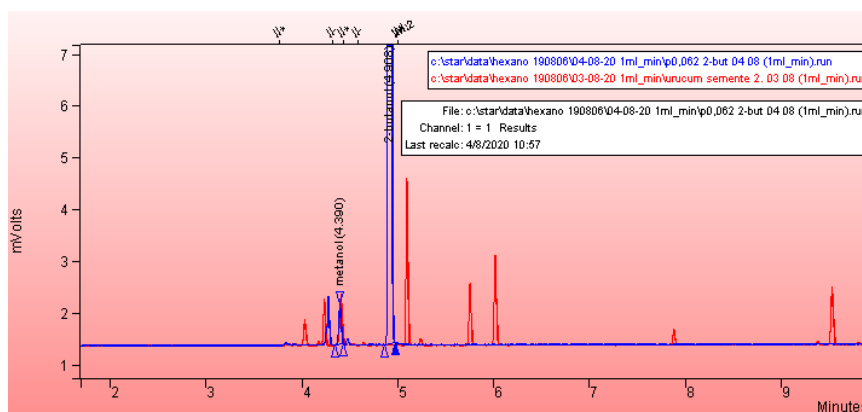


Figura 4. Cromatogramas com a injeção de um corante extraído das sementes de urucum e dos padrões metanol e 2-butanol (padrão interno).

A ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção do padrão interno e a confirmação por CG-MS do metanol como o pico coincidente com o tempo de retenção desse analito, indicou que o método apresenta a seletividade desejada.

3.2.2 Sensibilidade (limites de detecção e quantificação)

O limite de detecção foi estimado em 39mg/mL e o limite de quantificação foi estimado em 103mg/mL. Considerando que a FAO/WHO estabelece o limite de 50mg para a concentração de metanol em corantes de urucum extraídos com solventes orgânicos e com pureza superior a 85%, a metodologia estabelecida não poderia ser utilizada para a determinação desse tipo de corante. Contudo, avaliações preliminares apontou que o método é sensível suficiente para a determinação de corantes de urucum extraído com soluções alcalinas.

3.2.3 Precisão

O resultado para o cálculo do coeficiente de variação de cinco repetições analíticas indicou um valor de 5,56%, portanto inferior ao estabelecido para a equação de Horwitz para a concentração estudada (16%). Portanto o método foi considerado preciso para a análise proposta.

3.2.4 Exatidão

Os teores de recuperação em duplicata para três níveis de adição de metanol, em uma amostra de corante foi de 95,29% em média, com uma estimativa de desvio padrão de 2,95%. O



valor de t calculado foi de 3,91, superior ao valor de t tabelado para $p < 0,05$ igual a 2,57. Esse resultado indica que o método tem a exatidão adequada para o que se propõe.

4 CONCLUSÃO

O método estabelecido apresentou seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão compatíveis ao que se dispõe. As análises de corantes comerciais deverão ser realizadas em sequência para avaliar a presença de metanol nesses produtos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida ao primeiro autor.

6 REFERÊNCIAS

BRASIL. ANVISA, **Resolução nº2/04, de 15 de janeiro de 2007** (DOU nº12 de 17 de janeiro de 2007). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 22 jul. 2020.

BRASIL. ANVISA. **Informe técnico nº17, de 19 de janeiro de 2006**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2774540&_101_type=content&_101_groupId=33916&_101_urlTitle=informe-tecnico-n-17-de-19-de-janeiro-de-2006&inheritRedirect=true>. Acessado em: 22 de jul. 2020.

CARVALHO, P. R. N. **Urucum, situação atual e perspectivas**. In: www.ourucum.com.br. Março de 2018. Disponível em https://docs.wixstatic.com/ugd/413a1a_8b6dbf6ffcc94fb0b3964332_20a58240.pdf. Acessado em 15/07/2020.

CARVALHO, P. R. N.; 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**. v. 69, n. 3, p. 519-524, 2010.

FAO/WHO. **Compendium of Food Additives Specifications**. FAO Jecfa Monographs n.3, 2006, 91p.

FIRESTONE, D. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2017. Met. Ca 3b-87, Met. Ba 14-87.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Anal. Chem.** v.54, n. 1, p. 67A-76A, 1982.

IBGE - **Tabela 1613 - Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. 2018** Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Rio de Janeiro, RJ. Acessado em 03/03/2020.



14º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2020
01/10 a 02/10 de 2020 – Campinas, São Paulo
ISBN: 978-65-88414-00-2

PENTEADO, José Carlos P.; MAGALHÃES, Dulce; MASINI, Jorge C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2190-2193, 2008.

QUATTROCCHI, O. A. ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F. **Introdución a la HPLC Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA, 1992, p.301-328.