



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LINHA DE PESQUISA: CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
CAMPUS JUVINO OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE VARIEDADES DE URUCUEIROS *IN NATURA* E
ENCAPSULADO**

VIVIANE SANTOS MOREIRA

**ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
2013**

VIVIANE SANTOS MOREIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE VARIEDADES DE URUCUEIROS *IN NATURA* E
ENCAPSULADO.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a DSc. Tiyoko Nair Hojo Rebouças

**ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
2013**

633.86	Moreira, Viviane Santos.
M839a	<p data-bbox="424 846 1380 976">Atividade antioxidante e caracterização físico-química de urucum (<i>Bixa orellana</i> L.) <i>in natura</i> e encapsulado. / Viviane Santos Moreira. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013. 87fl..</p> <p data-bbox="424 1014 1380 1122">Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Stricto Sensu</i>” do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^ª. D Sc. Tiyoko Nair Hojo Rebouças.</p> <p data-bbox="424 1189 1380 1323">1. Urucum – Atividade antioxidante. 2. Urucum – Sementes – Características físico-químicas 3. Corante de urucum – Usos – Doenças. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Rebouças, Tiyoko Nair Hojo. III. Título.</p> <p data-bbox="1171 1357 1380 1391" style="text-align: right;">CDD(21): 633.86</p>

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Urucum: Atividade antioxidante.
2. Sementes de urucum: Características físico-químicas
3. Corante de urucum: Usos
4. *Bixa orellana* L.: Composição química



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

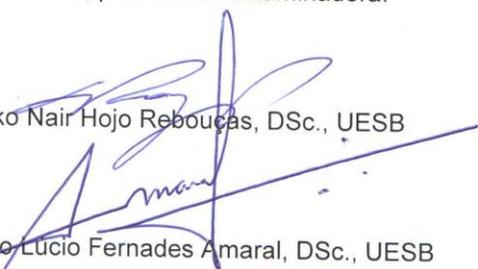
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE VARIEDADES DE URUCUEIROS *IN NATURA* E ENCAPSULADO.”

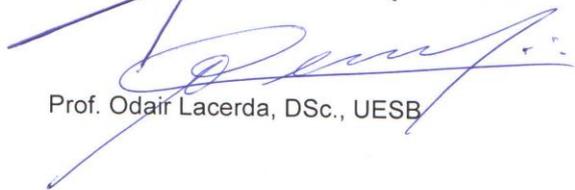
Autor: VIVIANE SANTOS MOREIRA

Orientadora: Prof^ª. TIYOKO NAIR HOJO REBOUÇAS, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^ª. Tiyoko Nair Hojo Rebouças, DSc., UESB


Prof. Cláudio Lucio Fernandes Amaral, DSc., UESB


Prof. Odair Lacerda, DSc., UESB

Data da Realização: 21 de Fevereiro de 2013.

*Aprendi que a vida bate sempre sem pudor
Que nem sempre as coisas são como a gente pensa
Que nem sempre o mundo gira como a gente quer
Aprendi que se eu cair devo me levantar
Que todo mundo vive altos e baixos
Que não vale a pena esperar*

*Viva intensamente
Desconfie do futuro, siga em frente
Basta acreditar, vale a pena sonhar*

*Nunca desista, vá em frente até acertar
E nunca deixe que o medo impeça de tentar
Leve na raça, faça o que o coração mandar
Não deixe nada para depois, não dá para esperar.*

(Vivo Intensamente - Matheus e Kauan)

À Edivanda Pereira e Dimitri Santos,
incentivadores da minha trajetória profissional.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pai de todas as criaturas, por todas as bênçãos que tem realizado em minha vida;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade de realização do curso;

À professora Tiyoko Nair Hojo Rebouças, pela orientação, competência e educação, auxílio em solucionar os imprevistos. Enfim, por todo cuidado e amizade;

Ao professor Abel Rebouças São José pela amizade, preocupação e constante transmissão de conhecimento;

À professora Lígia Miranda pelo incentivo, por acreditar que eu seria capaz;

Ao professor Marcondes Viana da Silva, pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do trabalho;

À Coordenação do Colegiado do Mestrado em Engenharia de Alimentos, na pessoa da professora Sibebe Passini;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional;

Aos Professores Mara Albuquerque, Mauro Figueiredo e Marcondes Viana por terem concedido as instalações do Laboratório de Fisiologia Animal, Laboratório de Nutrição Animal e o Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL), respectivamente, para condução parcial do experimento;

Aos amigos da Biofábrica, em especial Jailson Silva, Cinthia Souza, Marinês Bonfim, John Porto, Ellen Hojo pela ajuda fundamental nas análises, sem ajuda de vocês, o trabalho teria sido ainda mais árduo;

À Mateus Neto e Ádler Carvalho pela ajuda nas análises no Laboratório de Nutrição Animal;

À Girlana Amorim pela ajuda nas análises no Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL);

Aos colegas da turma, em especial, Bruna Braga, Amanda Faleiro, Maria Olímpia, Ozana Lessa, Renata Santana, Larissa Costa pelo apoio e por tornarem prazerosa a convivência durante o curso;

Um agradecimento especial à colega e amiga, Maria Olímpia Batista de Moraes pela amizade espontânea e sincera; a sua presença ajudou a tornar mais agradável este desafio;

À Noel Julião, da Fazenda Sempre Viva, por ceder a propriedade para realização das coletas;

À amiga Regina Silva por ter me acolhido na sua residência em Itapetinga – BA;

À Thiago Moreira R. Ferraz pela paciência e apoio durante todo esse tempo;

Ao meu irmão, Dimitri Santos, pelo auxílio nas análises de bixina;

À minha mãe Edivanda Pereira, por acreditar no meu potencial;

À Capes pelo auxílio financeiro;

À todos que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, meu muito obrigada!

RESUMO

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros *in natura* e encapsulado.** Itapetinga – BA: UESB, 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos).*

A espécie *Bixa orellana* originária na América Tropical é muito utilizada na indústria de corantes naturais. O corante de urucum possui coloração avermelhada devido à presença do carotenóide bixina presente no arilo da sua semente. O objetivo do trabalho foi de avaliar o potencial antioxidante e caracterizar quanto às propriedades físico-químicas de variedades de urucueiro *in natura* e em pó encapsulado. Para tanto, foram realizadas análises de umidade, cinzas, lipídeos, proteína bruta e carboidratos totais. Além de quantificação de compostos fenólicos, bixina e atividade antioxidante de três variedades de sementes: Peruana Paulista, Embrapa 37 e Focinho de Rato e três marcas de urucum em pó encapsulado. Para a quantificação de bixina utilizou-se o método KOH 5%, para compostos fenólicos o reagente Folin-Ciocalteu e na avaliação do potencial antioxidante utilizou-se o método ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)). Os resultados encontrados apresentaram altos índices de bixina para a variedade Embrapa 37, $4,83 \pm 0,6\%$ com diferenças significativas para as demais variedades. O teor de bixina dos produtos encapsulados foram numericamente mais baixos que os da semente, e a marca B apresentou índice mais elevado ($1,67 \pm 0,2\%$) que as demais. Quanto aos resultados de compostos fenólicos, as variedades de sementes não apresentaram diferença significativa, visto que os valores oscilaram entre $54,84 \pm 8,1$ e $65,13 \pm 2,7$ mg GAE $100g^{-1}$. Para o urucum encapsulado, a marca B apresentou índice de $49,80 \pm 7,5$ mg GAE $100g^{-1}$, significativamente maior que as marca A e C, $22,58 \pm 1,6$ e $27,47 \pm 5,3$ mg GAE $100g^{-1}$, respectivamente. As sementes de urucum e os produtos encapsulados apresentaram potencial antioxidante para o radical livre ABTS, sendo que nas variedades de sementes os valores variaram de $72,51 \pm 1,1$ a $84,99 \pm 1,0\%$ de inibição, não havendo diferença significativa entre elas. Nos produtos encapsulados, os índices foram ainda maiores, oscilando entre $86,80 \pm 0,95$ para encapsulado B, $94,73 \pm 0,1\%$ para encapsulado C e $98,41 \pm 0,2\%$ para o A, havendo diferença significativa entre todas as amostras. Os valores de atividade antioxidante foram superiores aos do antioxidante sintético BHT que apresentou $63,62\%$ de inibição. Tais resultados sugerem que a utilização de corantes de urucum pode proporcionar uma ação preventiva de doenças contribuindo de forma benéfica à saúde do ser humano.

PALAVRAS-CHAVE: corante natural, radical livre, bixina, fenóis.

*Orientadora: Tiyoko Nair Hojo Rebouças, DSc. UESB-DFZ, Vitória da Conquista – BA.

ABSTRACT

MOREIRA, V. S. **Antioxidant activity and characterization of physical chemistry of varieties of urucueiros in nature and encapsulated.** Itapetinga – BA: UESB, 2013. 87p. Dissertation (Master Degree in Food Engineering).*

The species *Bixa orellana* originated in Tropical America, widely used in the industry of natural dyes. The colorant annatto has reddish color due to the presence of the carotenoid bixin aryl present in the seed. The aim of this study was to evaluate the antioxidant potential and characterize the physicochemical properties of varieties of fresh and annatto powder encapsulated. Thus, we performed analyzes of moisture, ash, lipid, protein and total carbohydrates. Besides quantification of phenolic compounds bixin and antioxidant activity of three varieties of seeds: Peruana Paulista, Embrapa 37 and Focinho de Rato and three brands of annatto powder encapsulated. For quantification of bixin method was used 5% KOH to the phenol compounds Folin-Ciocalteu and for assessing the potential antioxidant method was used ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). The results showed high levels of bixin for variety Embrapa 37, $4.83 \pm 0.6\%$ with significant differences for other varieties. The bixin encapsulated products were numerically lower than those of the seed, and mark B showed higher rate ($1.67 \pm 0.2\%$) than the others. As to results of phenolic compounds, seed varieties showed no significant difference, whereas the values ranged from 54.84 ± 8.1 and 65.13 ± 2.7 mg GAE 100g⁻¹. To annatto encapsulated the brand B showed index 49.80 ± 7.5 mg GAE 100g⁻¹, significantly higher than the brand A and C, 22.58 ± 1.6 and 27.47 ± 5.3 mg GAE 100g⁻¹, respectively. The annatto seeds and encapsulated products showed potential antioxidant free radical ABTS, and the seed varieties values ranged from 72.51 ± 1.1 to $84.99 \pm 1.0\%$ inhibition, with no significant difference between them. In encapsulated products, rates were even higher, ranging from 86.80 ± 0.95 to encapsulated B, $94.73 \pm 0.1\%$ for encapsulated C and $98.41 \pm 0.2\%$ for A, significant difference between all samples. The antioxidant activity values were higher than those of the synthetic antioxidant BHT which showed 63.62% inhibition. Such results suggest that the use of annatto colorants may provide a preventive action against diseases contributing beneficially to human health.

KEYWORDS: natural dye, free radical, bixin, phenols.

*Advisor: Tiyoko Nair Hojo Rebouças, D.Sc. UESB DFZ, Vitória da Conquista – BA.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. a) Planta de Urucueiro; b) Sementes do urucum	20
Figura 2. Variedades de urucueiro: a) Embrapa 37 e b) Peruana Paulista	21
Figura 3. Diferentes tonalidades de cores obtidas com corantes de urucum	22
Figura 4. Estrutura química do ácido gálico e do ácido caféico	30
Figura 5. Estrutura química dos flavonoides	31
Figura 6. Rota biossintética simplificada dos compostos fenólicos.	32
Figura 7. Estrutura dos pigmentos do urucum	33
Figura 8. Interrelação dos pigmentos do urucum	34
Figura 9. Rota de biossíntese da bixina a partir do licopeno	35
Figura 10. Urucum em pó encapsulado	37
Figura 11. Sementes de urucum das variedades: a)Peruana Paulista, b)Embrapa 37 e c)Focinho de Rato	39
Figura 12. Pó de urucum encapsulado.	40
Figura 13. a)Moinho de bola; b)Trituração das sementes; c)Sementes e amostra moída. UESB, Itapetinga-BA, setembro de 2012.	41
Figura 14. Fluxograma do preparo da matéria-prima: semente de urucum. UESB, Itapetinga-BA, setembro de 2012.	42
Figura 15. a) Bloco digestor de proteínas; b)Destilador; c)Titulação com ácido clorídrico; d)Extrator Soxhlet; e) Amostras desengorduradas. UESB, Itapetinga-BA, setembro e outubro de 2012.	43
Figura 16. Solução corante filtrada de semente de urucum (esquerda) e extrato alcanino da semente de urucum(direita). UESB, Vitória da Conquista-BA, junho de 2012.	44
Figura 17. a) Banho ultrassônico com amostra de urucum; b) Extratos etanólicos das amostras de urucum. UESB, Itapetinga-BA, outubro de 2012.	45
Figura 18. Fluxograma do preparo dos extratos etanólicos de semente e pó de urucum encapsulado. UESB, Itapetinga-BA, outubro de 2012.	45
Figura 19. Mudança de coloração pelo sequestro do radical livre ABTS	47

LISTA TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Radicais livres	25
Tabela 2. Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres	25
Tabela 3. Doenças relacionadas com a geração de radicais livres	26
Tabela 4. Principais agentes de defesa antioxidante	27
Tabela 5. Custo unitário do produto pó de urucum encapsulado	40
Tabela 6. Caracterização físico-química das sementes de urucum: umidade, proteína bruta, lipídeos, cinzas e carboidratos totais (valores expressos em porcentagem). UESB, Itapetinga-BA, 2012.	49
Tabela 7. Caracterização físico-química do urucum em pó encapsulado, marcas A, B e C. (valores expressos em porcentagem). UESB, Itapetinga-BA, 2012.	52
Tabela 8. Teores de bixina e pH nos extratos alcalinos das sementes das variedades de urucum. UESB, Vitória da Conquista-BA, 2012.	53
Tabela 9. Classificação das sementes de urucum.	54
Tabela 10. Teores de bixina e pH dos extratos alcalinos do urucum em pó encapsulado, marcas A, B e C. UESB, Vitória da Conquista-BA, 2012.	55
Tabela 11. Teores de Fenólicos Totais nos extratos etanólicos de urucum em semente (valores expressos em mg GAE 100g ⁻¹). UESB, Itapetinga-BA, 2012.	56
Tabela 12. Teores de Fenólicos Totais nos extratos etanólicos de urucum encapsulado (valores expressos em mg GAE 100g ⁻¹). UESB, Itapetinga-BA, 2012.	57
Tabela 13. Percentual de Inibição do radical livre ABTS em extratos etanólicos de sementes. UESB, Itapetinga-BA, 2012.	58
Tabela 14. Percentual de Inibição do radical livre ABTS em extratos etanólicos de urucum encapsulado, A, B e C. UESB, Itapetinga-BA, 2012.	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Curva padrão de ácido gálico para quantificar compostos fenólicos de urucum <i>in natura</i> e encapsulado. UESB, Itapetinga-BA, 2012.	Pág. 56
------------	--	------------

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

●+	Radical livre
%	Porcentagem
AADH	2,2´azobiz amidinopropano
ABTS	2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
BA	Bahia
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
C	Carbono
CT	Carboidratos totais
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EE	Extrato etéreo/lipídeos
ESTs	Sequências expressas
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramas
GAE	Equivalente de ácido gálico
HO ₂ •	Radical hidroperóxido
IDA	Ingestão Diária Aceitável
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
Kg	Kilograma
KOH	Hidróxido de Potássio
LDL	Low Density Lipoprotein
LPO	Liperoxidação
mg	Miligrama
ml	Mililitros
min	Minutos
MM	Matéria mineral/cinzas.

NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ⁻	Radical superóxido
°C	Graus Celsius
OH•	Radical hidroxila
ONOO	Peroxinitrito
PB	Proteína bruta
pH	Potencial de hidrogênio
Q	Radical semiquinona
R\$	Moeda brasileira (Real)
RLO	Radicais livres de oxigênio
RFC	Reagente Folin-Ciocalteu
rpm	Rotações por minutos
SISVAR	Sistema de Análise de Variância
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
µm	Micrometros

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Urucum	19
<i>2.1.1 Aplicações do Urucum</i>	21
2.2 Plantas Medicinais	23
2.3 Radicais Livres e Estresse Oxidativo	24
2.4 Antioxidantes	26
<i>2.4.1 Estratégias de Defesa Antioxidante</i>	27
<i>2.4.2 Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante</i>	28
2.5 Compostos Bioativos	29
<i>2.5.1 Compostos Fenólicos</i>	29
<i>2.5.2 Carotenóides</i>	32
<i>2.5.2.1 Bixina e Norbixina</i>	33
<i>2.5.2.2. Extração dos pigmentos</i>	36
2.6 Encapsulamento de Urucum	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Obtenção de Matéria-prima	39
<i>3.1.1 Sementes</i>	39
<i>3.1.2 Urucum em Pó Encapsulado</i>	40
3.2 Preparo da Matéria-prima	41
3.3 Caracterização Físico-química	42
3.4 Determinação da Bixina por Espectrofotometria	43
3.5 Determinação de pH dos Extratos Alcalinos	44
3.6 Obtenção dos Extratos Etanólicos	45
3.7 Determinação de Compostos Fenólicos Totais por Espectrofotometria	46
3.8 Determinação de Atividade Antioxidante por ABTS	46
3.9 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Caracterização Físico-Química	49
<i>4.1.1 Variedades de urucueiros in natura</i>	49
<i>4.1.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado</i>	51
4.2 Determinação dos Teores de Bixina	53
<i>4.2.1 Variedades de urucueiros in natura</i>	53
<i>4.2.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado</i>	54
4.3 Determinação dos Fenólicos Totais	56
<i>4.3.1 Variedades de urucueiros in natura</i>	56
<i>4.3.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado</i>	57
4.4 Avaliação da Atividade Antioxidante por ABTS	58
<i>4.4.1 Variedades de urucueiros in natura</i>	58
<i>4.4.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado</i>	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72

1. INTRODUÇÃO

Diante da crescente tendência mundial de consumo de produtos livres de aditivos sintéticos, as indústrias vêm demonstrando crescente interesse em substituir os corantes artificiais pelos naturais em seus processos produtivos. Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais produzido e utilizado (OLIVEIRA, 2005).

O urucueiro (*Bixa orellana* L.) é uma planta originária da América Tropical, pertencente à família botânica Bixaceae (CASTRO et al, 2009). Os frutos são cápsulas que se abrem em duas partes iguais recobertas por espinhos flexíveis contendo numerosas sementes (FRANCO et al, 2002). No arilo da semente encontra-se uma fina camada do pigmento avermelhado, que foi e tem sido utilizado pelos indígenas tanto na aplicação medicinal, quanto como ornamento e proteção contra insetos, em forma de pintura sobre a pele (CASTRO et al, 2009).

O pigmento é muito utilizado na culinária e na indústria alimentícia em forma de corante natural, representando 90% dos corantes usados no Brasil, e 70% no mundo (MERCADANTE e PFANDER, 2001). Em geral, na indústria brasileira o urucum é utilizado para colorir manteigas, queijos, embutidos, sorvetes, refrigerantes e produtos de panificação. As indústrias têxteis, farmacêuticas e de cosméticos também utilizam o corante de urucum em muitos de seus produtos.

Os pigmentos naturais em alimentos podem ser derivados de diversas substâncias, entre elas substâncias fenólicas, produção de oxidação, derivados de porfirinas, como grupo heme e clorofilas, pigmentos escuros produzidos enzimaticamente ou não-enzimaticamente, complexos de metais pesados com proteínas ou compostos fenólicos e carotenóides e pigmentos relacionados. É preciso ressaltar que o número de corantes naturais disponíveis no mercado é reduzido, destacando-se o urucum, açafrão, extrato de beterraba, pimentão vermelho, extrato de casca de uva e carmim de cochonila (ARAÚJO, 2004).

Os principais corantes naturais de aplicação na indústria de alimentos são: as antocianinas, a clorofila, a riboflavina, as betalainas, os flavonóides, caramelos e os carotenóides.

O pigmento do urucum pode ser comercializado de diversas formas, desde extratos líquidos, em pastas, ou em pó. Outra forma de comercialização que vem ganhando espaço, devido a grande procura de produtos fitoterápicos são os microencapsulados. Essa técnica

permite que o produto encapsulado permaneça protegido da luz aumentando sua vida de prateleira e assim, aumentando seu valor agregado (CLARK, 2002).

O urucum possui muitos compostos bioativos, que são oriundos do metabolismo secundário das plantas. Dentre os principais compostos do urucum estão os compostos fenólicos e os carotenóides e por vezes estão envolvidos com as propriedades funcionais, entre elas a atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular, podendo agir de modo preventivo contra cânceres, problemas cardiovasculares e envelhecimento.

Esses compostos atuam como antioxidantes em proteção ao organismo humano contra os radicais livres. Essas defesas antioxidantes que podem ser naturalmente produzidas ou consumidas através da dieta. Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na alimentação é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997).

Diversas pesquisas reafirmam a ação antioxidante dos compostos bioativos do urucum, entre eles a bixina.

Weiss e Landdauer (2003) fizeram um levantamento de inúmeras substâncias potencialmente antioxidantes, dentre elas encontra-se a bixina, presente na semente do urucum, importante na indústria de corantes.

No trabalho de Zhang, Cooney e Bertram (1991) ao estudar o efeito de inibição da peroxidação, através de carotenos, como o beta-caroteno, a castaxantina, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, constatou-se a grande eficácia na inibição dos consequentes efeitos de transformações neoplásticas induzidas quimicamente. O alfa tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação, seguido pela bixina.

Sendo assim o objetivo do trabalho foi de avaliar o potencial antioxidante e caracterizar quanto às propriedades físico-químicas do urucum *in natura* e em pó encapsulado. Além quantificar os teores de bixina pelo método KOH 5% e compostos fenólicos totais pelo método de Folin-ciocauteau.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Urucum

O urucueiro é uma planta arbustiva (Figura 1a) denominada botanicamente de *Bixa orellana* L. pertencente à família botânica Bixaceae, originada da América Tropical, é uma planta rústica, perene, de origem pré-colombiana e pertence à flora amazônica (CASTRO et al, 2009).

A denominação *Bixa orellana* surgiu em forma de homenagem a Francisco Orellana, primeiro europeu a navegar o Amazonas (SILVA e FRANCO, 2000; MULLER, 1988; ENGELHARDT, ROED e DIDRIKSEN, 1988) que estudou a espécie (ALONSO, 2004). No entanto, a palavra no dito popular urucum é derivada do tupi *uru-ku*, que significa “vermelho” (CASTRO et al, 2009). Essa tintura vermelha era utilizada pelos indígenas na pintura corporal, camuflagem, tintura de objetos de cerâmica e artesanato (ALONSO, 2004).

Os primeiros registros escritos sobre essa planta foram encontrados na Carta de Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal em 1500, na qual descreve diversas espécies vegetais brasileiras, dentre elas, o urucum com a seguinte descrição: “... uns ouriços verdes, de árvores que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos, e eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam” (FILGUEIRAS e PEIXOTO, 2002).

O corante avermelhado do urucum ainda é utilizado pelos indígenas tanto na aplicação medicinal quanto como ornamento e proteção contra insetos, em forma de pintura sobre a pele. Esse corante que se localiza na fina camada do arilo da semente é conhecido como colorau ou colorífico, sendo muito utilizado na culinária para realçar a cor dos alimentos, embora não possua aroma nem sabor (CASTRO et al, 2009).

A planta *Bixa orellana* recebe diferentes denominações populares ao redor do mundo: urucu, urucum e açafroa, no Brasil; atole, achiote e bija nos países de Peru, Colômbia e Cuba; achiote, bija; onoto, na Venezuela; urukú no Paraguai; rocou e rocoyer na República Dominicana e Guiana francesa; rocoyer na França, e ainda changuaricá, pumacué, K‘uzub, no México (SANDI, CUEN e BACERRA, 2003) .

Quanto à estrutura, apresenta flores pentâmeras, com muitos estames e inflorescências paniculadas terminais de coloração rósea (JOLY, 1991). As flores são hermafroditas com cinco

sépalas surgindo nas extremidades dos ramos, formando fascículos onde nascem cápsulas ovóides com dois carpelos de espinhos flexíveis, com cinco pétalas orbiculares, glandulosas na base, decíduas, obovais e inteiras (SANTOS, 1958; BATISTA, 1988, MORAIS et al, 1999). Suas folhas são cordiformes, normalmente grandes, de coloração verde ou verde violeta (FALESI, 1987; PRESTON e RICKARD,1980). Os frutos são cápsulas ou cachopas, ovóides ou globulosa de 3 a 4cm de comprimento e 3 a 4,5cm de diâmetro, no qual encontra-se contendo numerosas sementes, envoltos por uma polpa de cor vermelha. As cápsulas são recobertas por espinhos e contém média de 40 a 50 sementes (FRANCO et al, 2002). As sementes são grosseiramente arredondadas, revestidas por uma polpa mole de coloração avermelhada, as quais tornam-se duras e secas de coloração escura com o amadurecimento (Figura 1b).

A planta pode alcançar até 6m de altura, possuindo um desenvolvimento rápido, com um potencial de produção de 40 a 50 anos. O urucueiro pode florescer e frutificar durante o ano todo, entretanto, a maior ocorrência são as floradas no período da primavera e outra no final do verão, esta última em maior produção (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996).



Fotos: MOREIRA, V.S., 2012.

Figura1. a) Planta de Urucueiro; b) Sementes do urucum

No Brasil, a cultura do urucum tem expandido pela facilidade de adaptação de sua cultura em diversas regiões do país e pelo aumento na demanda por corantes naturais. Várias são as variedades cultivadas, entre elas: Bico-de-pato: tipo vigoroso; percentual médio de bixina 2,5%; boa produtividade. Plantado principalmente no Estado da Bahia; Peruana paulista: tipo vigoroso; teor de bixina médio 2,5%; boa produtividade. Cultivado em diversas regiões, principalmente em São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pará; Piave: tipo vigoroso; alto teor de bixina superando os 3,0%; média produção. Cultivado no Estado do Pará (OLIVEIRA, 1996); Embrapa 36 e Embrapa 37: planta de porte médio, com níveis de bixina em tronco de 5% a 5,5%. Ambas provenientes de melhoramento genético (EMBRAPA, 2001).

As variedades Peruana Paulista e Embrapa 37 estão representadas nas Figuras 2a e 2b, respectivamente.



Fotos: MOREIRA, V.S., 2012.

Figura 2. Variedades de urucueiro: a) Peruana Paulista, b) Embrapa 37

De modo geral, a composição nutricional das sementes de urucum apresentam a seguinte distribuição: 40 a 45 % de celulose; 3,5 a 5,5 % de açúcares; 0,3 % a 0,9 % de óleo essencial; 3 % de óleo fixo; 1,0 % a 4,5 % de pigmento; 13 % a 16 % de proteína, como também alfa e beta caroteno além de taninos e saponinas. Apresenta ainda 17,5 % de lipídeos na forma de ácido linolênico, α linoleico e oleico, 10,6 % de aminoácidos. As cinzas (5,4 %) apresentaram alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, com reduzido teor de cálcio. Além da bixina e norbixina, outros carotenos são encontrados em menores quantidades no arilo da semente do urucum, entre eles isobixina, beta caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina (OLIVEIRA, 2005).

2.1.1 Aplicações do urucum

A principal aplicabilidade das sementes de urucum concentra-se na indústria de alimentos, onde é empregado como corante (SANDI, CUEN e BACERRA, 2003). Neste setor, a demanda por corantes naturais vem crescendo na medida em que se provam a toxicidade dos sintéticos, e a não toxicidade do corante do urucum. Deste modo, o corante de urucum é um dos poucos permitidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) para aplicação em alimentos (BARBOSA-FILHO et al, 1998).

Em geral, os corantes são utilizados pelas indústrias em seus produtos, com o objetivo de torná-los atrativos ao público consumidor. O consumo dos corantes naturais, além de colorir o produto final (NAZARÉ et al, 1996) ainda possui ação vitamínica, podendo atuar como precursor de vitamina A (OLIVEIRA et al, 2003).

Como corante alimentício, é vastamente aplicado em laticínios, como queijos, margarina e manteiga. No setor de embutidos, a principal utilização é na indústria de salsicharia. Há ainda usos nas indústrias de sorvetes, confeitaria e massas (LIMA et al, 2001).

Entre os corantes naturais, o urucum encontra-se em segundo lugar em importância econômica, atrás apenas do corante caramelo (MERCADANTE, STECK e PFANDER, 1997), amplamente utilizado pela indústria de refrigerantes.

Outro importante mercado dos pigmentos do urucum é a indústria de condimentos para fabricação de coloríficos, temperos e outros produtos usados na gastronomia brasileira, que representam cerca de 60% do volume total de urucum comercializado no Brasil. De acordo com Tocchini e Mercadante (2001) o colorífero pode ser uma mistura de urucum em pó com fubá de milho ou de mandioca. Este produto pode ter adição de sal e/ou óleos comestíveis.

No que diz respeito à Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os extratos de urucum, na década de 70, a IDA era de 1,25mg/kg de peso corpóreo, no entanto na década de 80 este número reduziu para 0,065mg/kg de peso corpóreo. A aplicação de extratos de urucum em alimentos tem sofrido restrições no que se refere à gama de produtos a que pode ser adicionado bem como quanto à quantidade permitida. Uma das alegações é que pouco se conhece sobre a composição desses extratos (FAO/OMS, 1970; FAO/OMS, 1976; FAO/OMS, 1980 citado por MERCADANTE e PFANDER, 2001).

Atualmente, o urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes e pigmentos vermelhos. Sua ampla utilização, também se deve a grande faixa no seu espectro de cores do corante, podendo ser usado em alimentos com cores fortes e em alimentos com cores menos intensa, como pode ser observada na Figura 3 (SANTOS, 2007).



Figura 3. Diferentes tonalidades de cores obtidas com corantes de urucum.

Fonte: SANTOS, 2007

2.2 Plantas medicinais

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (TAKAMURA, 2008).

Devido às observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais, passou-se a conhecer seus efeitos benéficos sem ao menos conhecer suas propriedades, constituição, composição química. Desta forma, a cultura popular contribuiu para a divulgação da ação terapêutica de determinados vegetais. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém ativo a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL, PINTO e VEIGA JÚNIOR, 2002).

No que diz respeito a medicamentos já desenvolvidos, os produtos naturais (incluindo produtos de microrganismo, animais e plantas) tem sido fonte da maioria deles. Até a década de 90, cerca de 80% dos fármacos eram produtos naturais, ou produtos inspirados nesses produtos, por exemplo: morfina, atropina, colchicina, penicilina, vincristina (HARVEY, 2008).

A pesquisa na área de plantas medicinais era até certo tempo atrás baseada apenas em testes de triagem farmacológicos e biológicos. Atualmente, essa área de pesquisa tem ganhado força, sendo realizada em níveis farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Os testes de triagem envolvem, atualmente, pesquisa molecular (TAKAMURA, 2008).

Acredita-se que 15% das espécies vegetais existentes no mundo tenham sido minuciosamente estudadas, estabelecendo relação com seu uso terapêutico. O Brasil é considerado o país mais rico em diversidade, detendo aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta, a grande maioria ainda não estudada. Diante dessa realidade, algumas medidas governamentais tendem a contribuir com as pesquisas na área de plantas medicinais. Diretrizes do Ministério da Saúde determinam algumas prioridades (especialmente espécies nativas) para a pesquisa nesta área (WAGNER, 2007).

Há muito tempo as plantas medicinais deixaram de ser uma opção terapêutica destinada à população carente (TAKAMURA, 2008). E passou a ser uma fonte bastante promissora de interesse terapêutico e neste contexto muitas espécies devem ser investigadas.

O urucueiro está sendo largamente empregado na medicina popular, seus extratos possuem potencial antimicrobiológico (IROBI, MOO-YOUNG e ANDERSON, 1996) anti-hemorragicos, expectorante na forma de xarope e para gargarejos, como laxativos,

estomáticos, cicatrizantes e contra dispepsia (LIMA et al, 2001). As sementes secas também se usam nos males de fígado, tuberculose, afecções do coração, problemas na pele, antipirético e antiinflamatório; as sementes servem, ainda, como antídoto para o ácido prússico que é aplicado nos casos de envenenamento com mandioca, como antídoto para o ácido cianídrico, na terapia de bronquite e em queimaduras (LIMA et al, 2001). Já as folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago, doenças coronarianas, intestino, afecções respiratórias e urinárias, e também como afrodisíaco (COELHO et al, 2003).

2.3 Radicais livres e estresse oxidativo

Guerra Filho e Fannan (1994) definem radicais livres como sendo moléculas que perderam um elétron de sua camada mais externa, ficando com outro desemparelhado. Por razões quânticas, esta molécula tende a emparelhar com outro de alguma outra molécula; por isto os radicais livres se tornam tão reativos. A reatividade varia com a estrutura química, temperatura e concentração de suas moléculas no meio de reação. Geralmente apresentam-se em concentrações de nanogramas (parte por bilhão).

A configuração dos radicais livres as torna moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). No entanto, a produção desses radicais livres em nosso organismo é inevitável, já que quando há necessidade de ativação do sistema imunológico, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos, há também, produção de radicais na desintoxicação de drogas e de óxido nítrico, importante para desencadear o relaxamento dos vasos sanguíneos (MONCADA e HIGGS, 2001).

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo por meio de processos metabólicos oxidativo (MONCADA e HIGGS, 2001). Em torno de 85% a 90% de oxigênio que respiramos é utilizado pela mitocôndria, e o restante, por diversas oxidases e oxigenases, com liberação do radical superóxido e água oxigenada, e por reações não-enzimáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A formação dos radicais livres é iniciada pelo oxigênio que possui muita facilidade em se reagir. Ao término da respiração aeróbica o oxigênio reduz-se a água, e então originam-se espécies altamente reativas, como o superóxido (O_2^-), radical hidroperóxido ($HO_2\bullet$) e o radical hidroxila ($OH\bullet$). Essas espécies estão envolvidos nos processos de peroxidação lipídica nas

membranas celulares (GUERRA FILHO e FANNAN, 1994). A Tabela 1 abaixo apresenta espécies reativas oriundas do oxigênio.

Tabela 1. Radicais livres

O₂-	radical superóxido
OH	radical hidroxila
NO·	óxido nítrico
ONOO	peroxinitrito
Q	radical semiquinona
O₂	oxigênio singlete

Fonte: BIANCHI e ANTUNES, 1999.

Quando a formação dos radicais livres ocorre em quantidades superiores às defesas antioxidantes, podem ocorrer distúrbios celulares e metabólicos de diversas maneiras (ARAÚJO, 2004).

Esse desequilíbrio favorável aos pró-oxidantes desencadeia um processo conhecido como estresse oxidativo. Esse estresse resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular, além dos danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função (SIES, 1986).

A formação de radicais livres pode ser ocasionada por fatores endógenos e exógenos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta
	Cigarro

Fonte: BIANCHI e ANTUNES, 1999

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas e aquelas relacionadas aos danos

de DNA (STAHL e SIES, 1997). A Tabela 3 mostra algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo celular.

Tabela 3. Doenças relacionadas com a geração de radicais livres.

Disfunção cerebral	Enfisema
Aterosclerose	Esclerose múltipla
Cardiopatias	Envelhecimento
Diabetes	Catarata
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune
Artrite	Câncer

Fonte: BIANCHI e ANTUNES, 1999

A defesa contra os radicais livres vêm de ação de antioxidantes que podem ser encontrados na dieta ou serem naturalmente produzidos (POMPELLA, 1997).

Dentre os ingeridos na dieta estão incluídos o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathione reduzida. E os sintetizados pelo organismo constituem o superóxido dismutases, catalase e glutathione peroxidase (YU, 1994). Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados, é necessário um adequado equilíbrio dos compostos pró e antioxidantes (ARAÚJO, 2004).

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis com formação de radicais livres. Naturalmente, alguns antioxidantes são produzidos pelo corpo humano e outros podem ser adquiridos pelo consumo de alimentos (ARAÚJO, 2004).

Sies e Stahl (1995) definiram antioxidantes como uma substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Principais agentes de defesa antioxidante.

Não-enzimático	Enzimático
L-cisteína	Superóxido dismutase
Curcumina	Catalase
β -caroteno	NADPH-quinona oxidoreductase
α -tocoferol (vitamina E)	Glutaciona peroxidase
Proteínas do plasma	Enzimas de reparo
Selênio	
Glutaciona	
Clorofilina	
Flavonóides	
Ácido ascórbico (vitamina C)	

Fonte: BIANCHI e ANTUNES, 1999

2.4.1 Estratégias da defesa antioxidante

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, tais como: (i) impedindo a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre; (ii) interceptando os radicais livres para que não ataquem os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular; ou (iii) reparando das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

O desempenho dos antioxidantes depende do tipo de radical livre que foi formado, desta forma, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros tecidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Por exemplo, a vitamina C atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos (ODIN, 1997).

Após a ação dos antioxidantes, há uma conversão para novos radicais de baixa reatividade. Esta ação consiste basicamente em doar um elétron aos radicais prevenindo a oxidação de biomoléculas, tornando os radicais menos instáveis.

A superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase são importantes enzimas antioxidantes, que agem rapidamente sobre as espécies reativas de oxigênio (VOEGELI et al, 1992). A superóxido dismutase está presente na forma de duas isoenzimas. Uma localiza-se no citoplasma que contém cobre e zinco; a outra apresenta magnésio em sua estrutura e é mitocondrial. Essa enzima é considerada como protetora da longevidade, pois é essencial para todos os organismos que necessitam de oxigênio para sobreviver. Atua sobre os radicais superóxido e hidroperóxido pela conversão destes em peróxido de hidrogênio e oxigênio.

As catalases agem sobre, o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em duas moléculas de água e uma de oxigênio. Essa enzima está presente nos peroxissomos e catalisa a reação de conversão do peróxido de hidrogênio de forma muito rápida, quase que concomitantemente à formação dessa molécula (ESTEVE e KRIESTEN, 1990).

Já a glutathione peroxidase é um complexo de várias enzimas que dependem de selênio para atuar sobre a redução do peróxido de hidrogênio, de radicais hidroperóxidos e de ácidos graxos peroxidados (ESTEVE e KRIESTEN, 1990).

2.4.2 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais baseiam-se na habilidade do antioxidante em sequestrar radicais livres.

O sistema β -caroteno/ácido linoléico trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo. A determinação é efetuada a 470 nm, na presença e ausência de um antioxidante (RUFINO et al, 2006).

O método ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) é um dos mais utilizados entre os testes indiretos de avaliação da atividade antioxidante, que consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), provocada pela adição de uma amostra contendo fenólicos. A quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra (RUFINO et al, 2007).

Outro método muito utilizado é o DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que é um radical estável em solução e que reage com compostos capazes de doar elétrons. Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção

decrece e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE e FONSECA, 2005).

2.5 Compostos bioativos

Compostos bioativos são identificados como sendo compostos envolvidos no metabolismo secundário de plantas, sendo desta forma restrita a determinados grupos de vegetais. Esses compostos estão relacionados com suas propriedades funcionais, e, portanto, possuem características benéficas à saúde (STRINGHETA, 2004). Devido a popularidade dos medicamentos fitoterápicos, a busca por esses compostos bioativos tem ganhado mais reconhecimento (DINIZ, ASTARITA e SANTAREM, 2007).

Quando um alimento afeta de modo benéfico uma ou mais funções do corpo, além de possuir efeitos nutricionais adequados, sendo relevante ao bem estar e saúde humana, é considerado um alimento funcional (ROBERFROID, 2002). Essa terminologia surgiu no Japão com o intuito de estimular o consumo de alimentos saudáveis, atuando na redução do risco de doenças (COLLI, 1998).

Dentre os compostos bioativos considerados funcionais estão os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos) e os carotenóides (beta-caroteno, licopeno, luteína, bixina) que constituem um importante grupo (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Deve ser enfatizado que, devido a diferenças genéticas, um alimento funcional não será necessariamente funcional para todos os membros de uma população. Ressalta-se ainda, que não existe uma recomendação de dose mínima de ingestão diária de compostos com propriedades funcionais (CARVALHO et al, 2006).

A planta *Bixa orellana* destaca-se pela presença restrita do carotenóide bixina e norbixina, que são pigmentos de importância comercial. Além disso, pode-se encontrar outros constituintes químicos como os flavonóides: glucosídeo de apigenina, bisulfato de apigenina e hipoaletina (ALONSO, 2004) e também ácido gálico, ácido alfitólico, óleo essencial, diterpenos (geraniol, geranil), além de vestígios de alcalóides.

2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem importantes funções fisiológicas e morfológicas, e são amplamente distribuídos no reino vegetal (HARBORNE, 1994). Cerca de 8.000 diferentes

compostos fenólicos são encontrados na natureza, que englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, além disso, estes compostos podem ser encontrados nos vegetais na forma livre ou ligados a moléculas de açúcares (BRAVO, 1998). A maioria dos compostos fenólicos naturais encontra-se conjugados com mono e polissacarídeos bem como a outros grupos funcionais tais como, ésteres e metil ésteres (WATERMAN e MOLE, 1994).

Segundo Harbone (1994), os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos: os fenóis simples, apresentando único anel aromático, contendo uma ou mais hidroxilas substituintes e os polifenóis, que são constituídos de duas ou mais unidades monoméricas, fenólicas, até compostos poliméricos. Sendo considerados fenóis simples, os ácidos fenólicos e os flavonóides, e os polímeros como os taninos e ligninas (RIBÉREAU-GAYON, 1968 citado por SANTOS, 2009).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (ácidos caféico) e ácidos hidroxicinâmicos (ácidos gálico), ambos envolvidos na germinação de semente e crescimento (BRAVO, 1998). A Figura 4 apresenta a estrutura química do ácido gálico e ácido caféico.

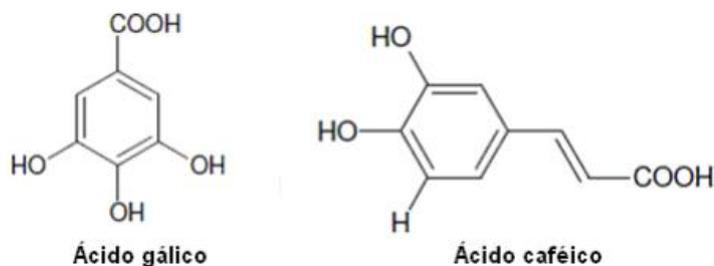


Figura 4: Estrutura química do ácido gálico e do ácido caféico.

Fonte: Balasundram, Sundram e Samman, 2006.

Os flavonóides estão presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração $C_6-C_3-C_6$ (HARBONE, BAXTER e MOSS, 1999).

Devido a suas propriedades antioxidantes os flavonóides estão envolvidos na prevenção de doenças como, alergias, inflamações, artrites, doenças cardiovasculares, arteriosclerose, doenças degenerativas e câncer (KATSUBE et al, 2003; ABDILLE et al, 2005).

Sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por um anel pirano C. Quanto aos anéis A e B, diferem-se pelo potencial antioxidante, já que o

anel B possui maior capacidade eletro-doadora, conforme Figura 5 (MERKEN e BEECHER, 2000; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

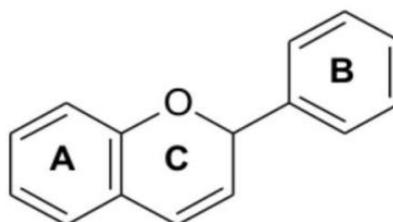


Figura 5. Estrutura química dos flavonóides.

Fonte : Balasundram, Sundram e Samman, 2006.

Os taninos possuem o peso molecular relativamente alto constituem uma classe de polifenóis e de acordo com a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis (OSZMAINSKI et al, 2007)

Os taninos condensáveis, também chamados proantocianidinas, são polímeros de unidades de flavonóides do tipo flavanóis, como as catequinas e epicatequinas. Estes compostos podem conter de duas até cinquenta unidades de flavonóides. Também são responsáveis pelo sabor adstringente dos alimentos (MONTEIRO et al, 2005)

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (KING e YOUNG, 1999; BURNS et al, 2000; PORTER, 1989).

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e anticarcinogênica estando relacionada com a inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. (PIMENTEL, FRANCKI e GOLLUCKE, 2005)

Eles podem ser sintetizados através de duas rotas biossintéticas distintas, a rota do chiquimato onde originam-se os fenilpropanóis e coumarinas e a rota do acetato que produz as fenonas e quinonas. Esses produtos podem originar outros compostos fenólicos, por meio de rotas secundárias (ESCARPA e GONZALES, 2001). A Figura 6 apresenta as rotas de biossíntese dos fenólicos.

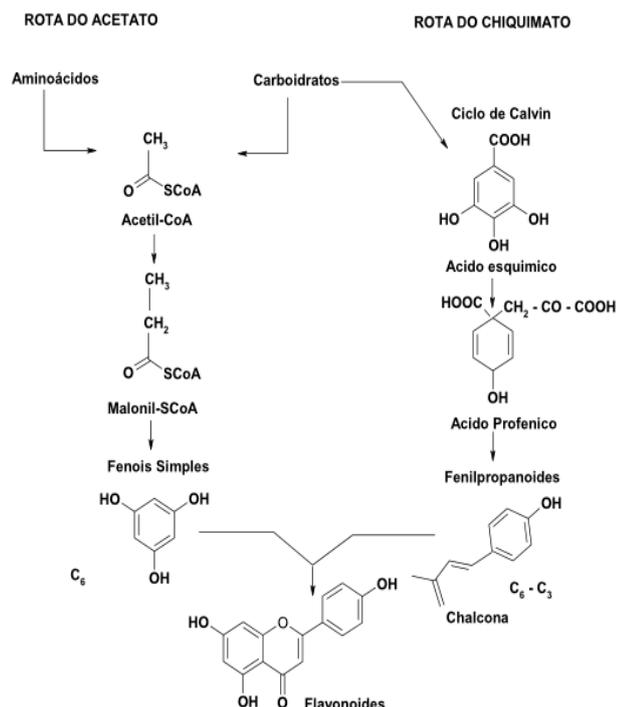


Figura 6. Rota biossintética simplificada dos compostos fenólicos.

Fonte: ESCARPA e GONZALES (2001)

2.5.2 Carotenóides

Os carotenóides possuem estrutura insaturada de hidrocarbonetos terpênicos e podem conter grupos de hidroxilas, carbonilas e carboxilas, nestes casos são denominados xantofilas. São formadas por moléculas de isopreno (C_5) ligadas em 1-4 (BOBBIO e BOBBIO, 1992a).

São substâncias coloridas amplamente distribuídas em plantas. Existem alguns encontrados na natureza como luteína, violaxantina, neoxantina, beta-caroteno e outros bem restritos a algumas plantas, como licopeno, bixina e capsantina (BOBBIO e BOBBIO, 1992b). São os pigmentos mais difundidos da natureza, sendo responsáveis pela coloração amarela, laranja, e vermelha de flores, frutos e folhas (BOBBIO e BOBBIO, 1992a).

Segundo Lima et al (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina, carotenóides presentes na planta urucum tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado, principalmente, pela lipoproteína LDL oxidada e, portanto, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

Os carotenóides possuem muitas funções biológicas, entre elas a ação antioxidante contra os radicais livres. Com isso, o consumo de alimentos ricos em carotenóides na dieta humana, deve ser utilizado para prevenção e tratamento de algumas enfermidades.

2.5.2.1 Bixina e norbixina

A bixina é um apocarotenóide monometil éster carboxílico que confere a coloração vermelha às sementes de urucum, o qual tem sido extraído e utilizado como corante aditivo solúvel em alimentos e cosméticos desde o período pré-Colombiano. Sua estrutura química é composta por uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, apresentando assim, a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O$. É lipossolúvel, solúvel em clorofórmio, acetona, éter etílico, etanol e insolúvel em água (MERCADANTE e PFANDER, 1998).

É possível encontrar outros pigmentos presentes na semente do urucum, entre eles a norbixina. A norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) é o derivado desmetilado da bixina que, apesar de ocorrer naturalmente, é quase sempre referida como produto da saponificação da bixina, sendo esta a sua forma de obtenção para fins comerciais (MERCADANTE e PFANDER, 1998). É um composto hidrossolúvel, insolúvel em álcool, propileno glicol, óleo e gordura.

A Figura 7 mostra a estrutura química dos pigmentos bixina e norbixina.

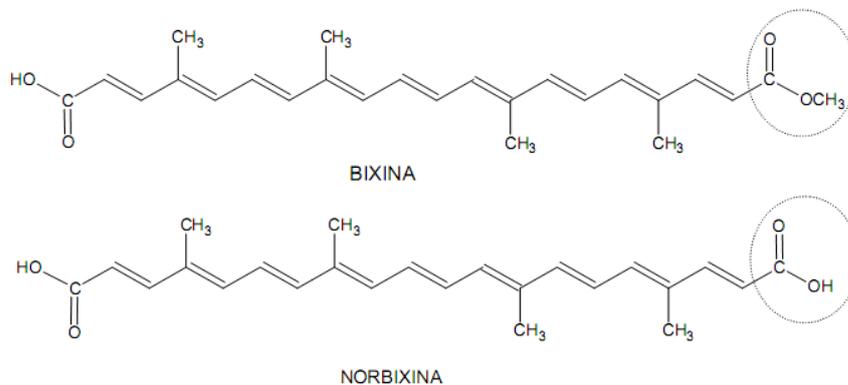


Figura 7. Estrutura dos pigmentos do urucum

Fonte: COSTA, 2007

Ambos corantes apresentam duas configurações estereoquímicas, isto é, *cis* e *trans*. A *cis*-bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares, onde apresenta uma coloração mais alaranjada, porém insolúvel em óleos vegetais, podendo se converter rapidamente em *trans* isômeros devido a sua instabilidade. A *trans*-bixina tem propriedades semelhantes ao isômero *cis*, porém apresenta coloração vermelha em solução e é solúvel em óleo vegetal. Os isômeros *cis*-bixina, *trans*-bixina, *cis*-norbixina e *trans*-norbixina diferem em algumas características físicas (SATYANARAYANA, PRABHAKAR e RAO, 2003). Em extratos nas condições normais, há predomínio da *cis*-bixina e *cis*-norbixina, mas em condições de

aquecimento são parcialmente mudadas para trans-bixina e trans-norbixina, estando assim em sua forma mais estável (PIMENTEL, 1995). A Figura 8 mostra a inter-relação dos pigmentos dos urucum.

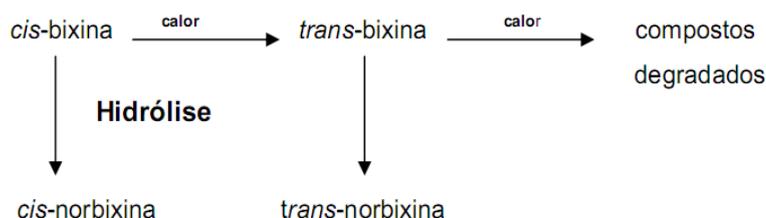


Figura 8. Inter-relação dos pigmentos do urucum
Fonte: SILVA, 2007

Vários outros carotenóides (C19, C22, C24, C25, C30, C32) já foram identificados, e constituem uma parcela minoritária dos pigmentos. Dentre eles o geranilgeraniol apresenta maior expressividade (representando 1% das sementes secas) (MERCADANTE e PFANDER, 1998).

O mecanismo de biossíntese de bixina permanece pouco conhecido. Entretanto, foi sugerido que o carotenóide de 40 carbonos, licopeno, seja seu precursor (MERCADANTE, STECK e PFANDER, 1997; JAKO et al, 2002; BOUVIER et al, 2003a). Baseado na similaridade estrutural entre bixina e o pigmento crocetina do açafrão, a reação de biossíntese de bixina pode envolver a ação de uma dioxigenase, uma desidrogenase do aldeído e uma metiltransferase, numa série de reações procedendo sequencialmente a partir de licopeno. Essa suposta rota de biossíntese de bixina é sustentada (i) pela análise de derivados da clivagem de licopeno que se acumulam em pequenas quantidades em sementes de urucum (MERCADANTE, STECK e PFANDER, 1997), (ii) pela recente caracterização de dioxigenases de plantas que clivam o cromóforo dos carotenóides em sítios definidos (BOUVIER, DOGBO e CAMARA, 2003b) e (iii) pela introdução desses três genes derivados de urucum em cepas de *Escherichia coli* engenheiradas para produção de licopeno, os quais induziram a síntese de bixina (BOUVIER et al, 2003a). A possível rota de biossíntese de bixina a partir do licopeno está representada na Figura 9.

A extração da bixina pode ser realizada por diversas metodologias, uma bastante utilizada é pelo método KOH (hidróxido de potássio), que é uma base forte que promove a saponificação parcial do grupo éster da bixina em sua forma hidrossolúvel, ou seja, o sal da norbixina. A concentração utilizada, em geral é de 5%, já que trabalhos corroboram que a saponificação ocorre em concentrações de KOH acima de 1%, ou ainda que a saponificação de bixina em norbixina ocorra em valores de pH maiores de 10. Sendo assim, a concentração do solvente e o pH possui maior dependência para reação de saponificação que outros fatores, como temperatura (SILVA, 2007; NACHTIGALL et al, 2009).

Fato este confirmado por trabalho realizado por Silva, Nachtigall e Stringheta (2009) em que foram testadas diferentes concentrações de KOH (0.6%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%). Os pesquisadores concluíram que a maior concentração foi a que promoveu maior conversão de bixina em norbixina e na menor concentração a reação não ocorreu.

2.5.2.2 Extração dos pigmentos

A extração de corantes de urucum possibilita obter no mesmo tipo de semente, corantes solúveis em água e corantes solúveis em óleo, alterando-se apenas o solvente de extração. Isso por sua vez, torna o urucum uma das matérias-primas mais importantes e interessantes em estudo (LIMA et al, 2001).

Visto isso, os pigmentos das sementes do urucum podem ser extraídos por diferentes processos: mecânicos (atrato e raspagem) e físico-químicos (solventes, enzimas). A extração por solventes pode ser feita por três métodos básicos, extração alcalina (solução de NaOH ou KOH), em que resulta na conversão da norbixina e bixina, extração com óleo (soja ou milho) e a extração por meio de solventes orgânicos (clorofórmio, etanol, acetona e propilenoglicol), que resulta na forma mais pura dos pigmentos (ALVES, 2001).

A partir dos extratos obtidos com KOH 0,6% e NH₄OH 2% são produzidos os corantes em pó em *spray-dryer*, e os extratos hidroalcoólicos e alcoólicos dão origem a corantes em pasta (PIMENTEL, 1995; CASTRO, 1992).

2.6 Urucum em pó encapsulado

A encapsulação é um processo de empacotamento de partículas (compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes) em cápsulas comestíveis. O

material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (AZEREDO, 2005).

Alguns dos objetivos da encapsulação de componentes de alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados); evitar reações prematuras de um substrato; mascarar compostos de sabor indesejável; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos. Outro importante objetivo é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir da ocorrência de um certo evento (AZEREDO, 2005).

Ingredientes nutricionais, como vitaminas, ácidos graxos, poliinsaturados, minerais, antioxidantes podem ser microencapsulados, aumentando a vida útil de produto, reduzindo a violabilidade e degradação oxidativa e assim, aumento seu valor agregado (CLARK, 2002). A Figura 10 apresenta urucum em pó encapsulado.



Fonte: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 10. Urucum em pó encapsulado

O urucum em pó encapsulado é comercializado em forma de suplemento Vitamina A. Na Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA existem três produtos registrados como suplemento de Vitamina A a base de urucum, na categoria suplemento vitamínico ou mineral.

Os principais métodos de microencapsulamento segundo Souza (2000) são: processos químicos: coacervação, incompatibilidade polímero-polímero, polimerização interfacial em interfaces líquido-líquido, polimerização *in situ*, evaporação de solvente, extrusão em bocal

submerso. E processos mecânicos: *spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*, leito fluidizado, polimerização interfacial em interfaces sólido-gás e líquido-gás, extrusão com centrifugação, extrusão ou gatejamento em um banho de dessolvatação, separação por suspensão rotacional (*spinning disk*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Pesquisa e Produção de Microrganismos (BIOFÁBRICA), Laboratório de Nutrição Animal, *campus* de Vitória da Conquista – BA e Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos, *campus* Itapetinga-BA na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. As análises foram realizadas entre os meses de julho e outubro de 2012.

3.1 Obtenção de matéria – prima

3.1.1 Sementes

Foram utilizadas três variedades de sementes de urucum: Peruana Paulista, Embrapa 37 e Focinho de Rato (Figura 11). As variedades Peruana Paulista e Focinho de rato foram coletadas no banco de germoplasma da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no município de Vitória da Conquista - BA nos meses de Março/2012 e Junho/2012, respectivamente. Esta região é caracterizada como clima tropical, de altitude em torno de 900 m e precipitação pluviométrica variável entre 700 mm a 1200 mm anuais, com temperatura média anual variando entre 18 e 25°C. A área está localizada nas coordenadas geográficas de 14°51´ Latitude Sul e 40°50´ Longitude Oeste. A vegetação predominante na região é Mata de Cipó, sendo uma transição entre caatinga e Mata Mesófila (NOVAES e SÃO JOSÉ, 1992).

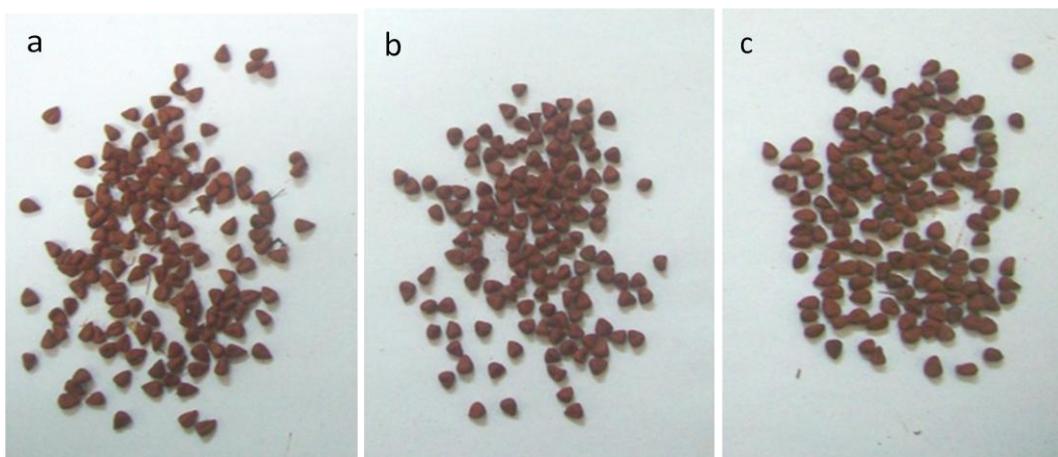


Foto: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 11. Sementes de urucum das variedades: a) Peruana Paulista, b) Embrapa 37 e c) Focinho de Rato.

A variedade Embrapa 37 foi coletada na Fazenda Sempre Viva localizada na BR-367, Eunápolis – BA no mês de junho de 2012. O município possui altitude de 183 m, com coordenadas geográficas de 16° 22´ Latitude Sul e 39° 34´ Longitude Oeste. A região apresenta vegetação predominante Mata Atlântica com clima equatorial e índice pluviométrico de 1800 mm/ano, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger.

3.1.2 Urucum em pó encapsulado

Os produtos industrializados de urucum em pó encapsulado (Figura 12) foram adquiridos em lojas de produtos naturais, no período de fevereiro a julho de 2012, nas cidades de Vitória da Conquista e Itabuna, na Bahia. Foram utilizadas três marcas, sendo identificados como urucum em pó encapsulado A, B e C. Os produtos encapsulado das marcas B e C são registrados na ANVISA na categoria suplemento vitamínico e mineral. Os custos unitários dos produtos estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5. Custo unitário do produto pó de urucum encapsulado. UESB, Itapetinga - BA, julho de 2012.

Marcas	Cápsulas	mg	R\$ (reais)
A	60	500 (urucum)	15
B	60	450 (urucum+vitamina A)	27
C	120	250 (urucum+vitamina A)	20

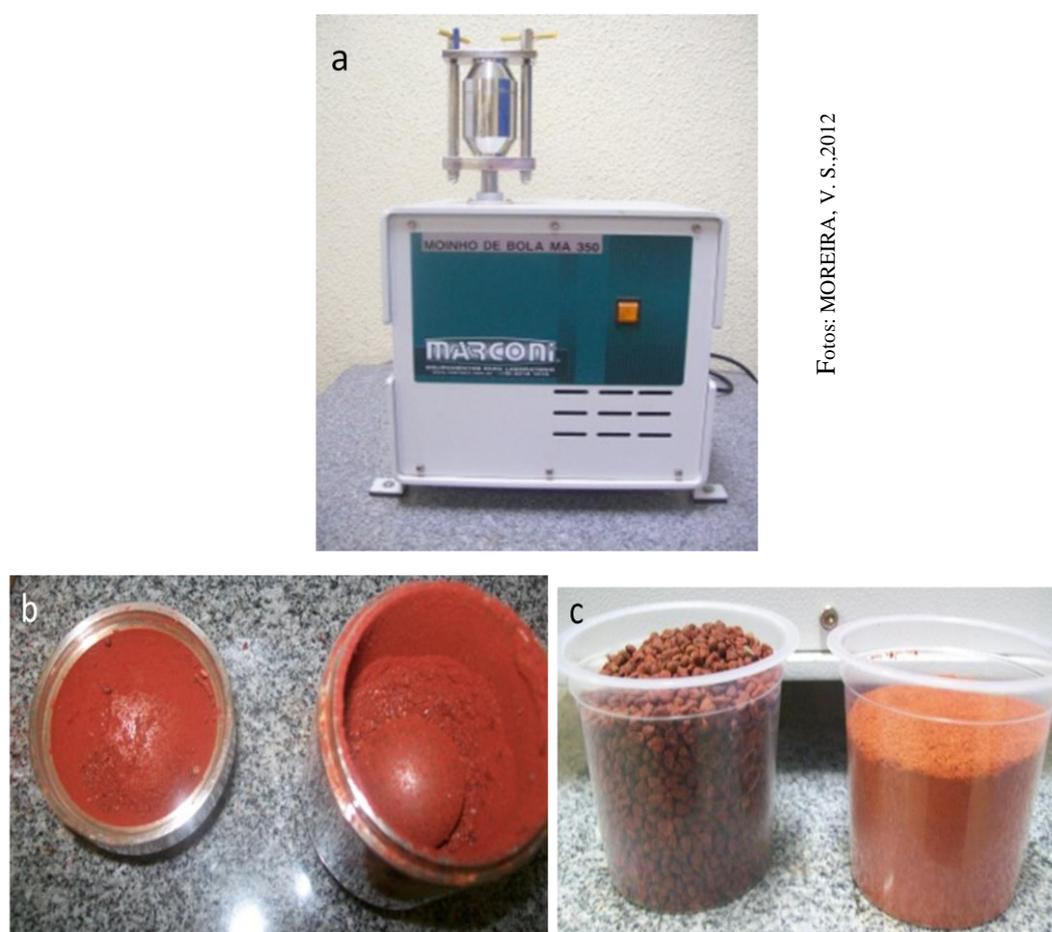


Foto: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 12. Pó de urucum encapsulado. UESB, Itapetinga - BA, julho de 2012.

3.2 Preparo da matéria-prima

Os grãos de urucum provenientes das três variedades foram secos em estufa de circulação fechada, por 72 horas a 55°C. Posteriormente foram trituradas utilizando um moinho de bola MA 350 e classificados em peneiras com tamanho da partícula igual 180 µm, para que atingisse granulometria próxima a do urucum em pó encapsulado (Figura 13). As frações obtidas foram acondicionadas em sacos de polietileno de coloração escura e mantidas em local seco a temperatura ambiente (25±1°C), protegido de luz.



Fotos: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 13. a) Moinho de bola; b) Trituração das sementes; c) Sementes e amostra moída.

UESB, Itapetinga - BA, setembro de 2012.

A Figura 14 apresenta o fluxograma do preparo dos grãos de urucum.

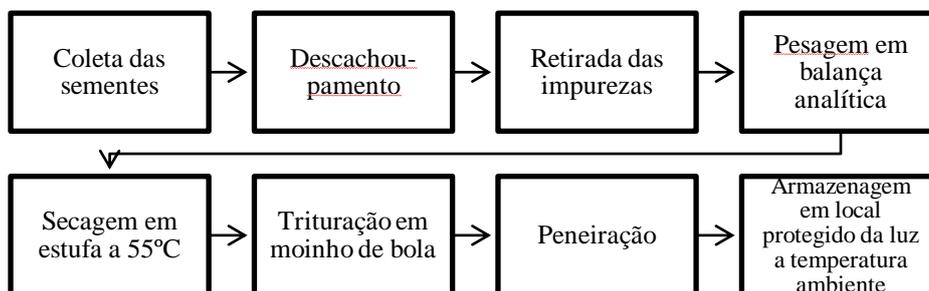


Figura 14. Fluxograma do preparo da matéria-prima: semente de urucum. UESB, Itapetinga - BA, setembro de 2012.

3.3 Caracterização físico-química

Para as análises de caracterização físico-químicas foram utilizadas as amostras de semente trituradas e pó de urucum encapsulado.

A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa, a temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, utilizando 5g de amostra triturada, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), com valores expressos em porcentagem.

O teor de cinzas foi determinado de acordo com metodologia proposta pela AOAC (1995). Pesou-se cerca de 2 g de amostra moída e submeteu-se à incineração em mufla a 550°C por 4 horas até obtenção do resíduo de coloração cinza esbranquiçada, com valores expressos em porcentagem.

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldhal proposto por Silva e Queiroz (2002) recolhendo-se a amônia liberada em ácido bórico a 4 %, com valores expressos em porcentagem, utilizando o fator de conversão nitrogênio/proteínas de 6,25.

Os lipídios totais foram determinados segundo procedimento recomendado pela AOAC (1995), mediante extração em extrator Soxhlet, utilizando 1 g de amostra com éter de petróleo como solvente extrator durante 8 horas, com valores expressos em porcentagem.

O conteúdo de carboidratos totais foi determinado por diferença conforme metodologia proposta por Sniffen et al (1992), determinado pela expressão $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$, em que CT= carboidratos totais, PB=proteína bruta; EE=extrato etéreo/lipídeos; MM= matéria mineral/cinzas. Valores expressos em porcentagem.

A Figura 15 apresenta os procedimentos realizados nas análises de proteína bruta e lipídeos.



Fotos: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 15. a) Bloco digestor de proteínas; b) Destilador; c) Titulação com ácido clorídrico; d) Extrator Soxhlet; e) Amostras desengorduradas.

3.4 Determinação da bixina por espectrofotometria

De acordo com o método proposto por Yabiku e Takahashi (1991), a extração da bixina foi realizada com KOH (hidróxido de potássio) 5%, que consistiu em pesar 25 g da amostra (sementes de urucum, base seca/ pó de urucum encapsulado), utilizando balança analítica digital FA 2012N. Em um erlenmeyer de 500 ml foi adicionado 150 ml da solução de KOH a 5% e colocou-se para ferver. Ao entrar em ebulição, foi colocado as sementes, mantendo-as por 1 minuto. Sem agitar, esfriou em água corrente. Em um balão volumétrico de 1000 ml, filtrou-se a solução e, posteriormente, lavou-se com água destilada (100 ml) por sete a nove vezes, e completou o balão até 1000 ml. Finalmente, tomou-se uma alíquota de 2

ml da solução corante filtrada, Figura 16, e colocou em outro balão volumétrico de 1000 ml completando do volume com a solução de KOH a 0,5%, fornecendo o extrato alcalino (Figura 16). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 453nm e célula de 1 cm de percurso óptico, contra um branco de solução de KOH a 0,5%. Foram realizadas três leituras para cada tratamento. Utilizou-se a seguinte equação para calcular o teor de bixina:

$$Bi(\%) = \frac{Ab \cdot fD \cdot V}{m \cdot E} \times 1,037, \text{ onde:}$$

Ab = absorvância

fD = fator de diluição (1000ml)

V = volume inicial do extrato

E = coeficiente específico de extinção (3473)

m = massa de semente (25g)

1,037 = fator de conversão



Foto: MOREIRA, V. S., 2012

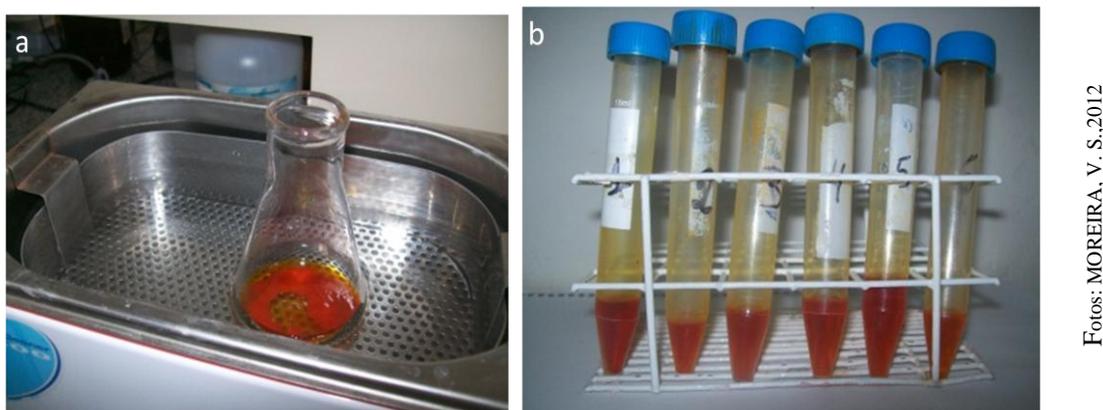
Figura 16. Solução corante filtrada de semente de urucum (esquerda) e extrato alcalino da semente de urucum (direita). UESB, Vitória da Conquista- BA, junho de 2012.

3.5 Determinação de pH dos extratos alcalinos

O pH foi determinado por pHmetro digital, com imersão direta em, aproximadamente 100ml dos extratos alcalinos.

3.6 Obtenção dos extratos etanólicos

Os extratos foram obtidos por processo de extração utilizando 1g de amostra desidratada mantida em banho ultrassônico, em três tempo de 25 minutos, sendo acrescentado a cada tempo 5ml de álcool etílico (80%), a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 9000 rpm, por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio com tampa e acondicionados a -18°C , conforme Figura 17.



Fotos: MOREIRA, V. S., 2012

Figura 17. a) Banho ultrassônico com amostras de urucum; b) Extratos etanólicos das amostras de urucum. UESB, Itapetinga - BA, outubro de 2012.

A Figura 18 mostra o fluxograma dos procedimentos realizados na obtenção dos extratos.

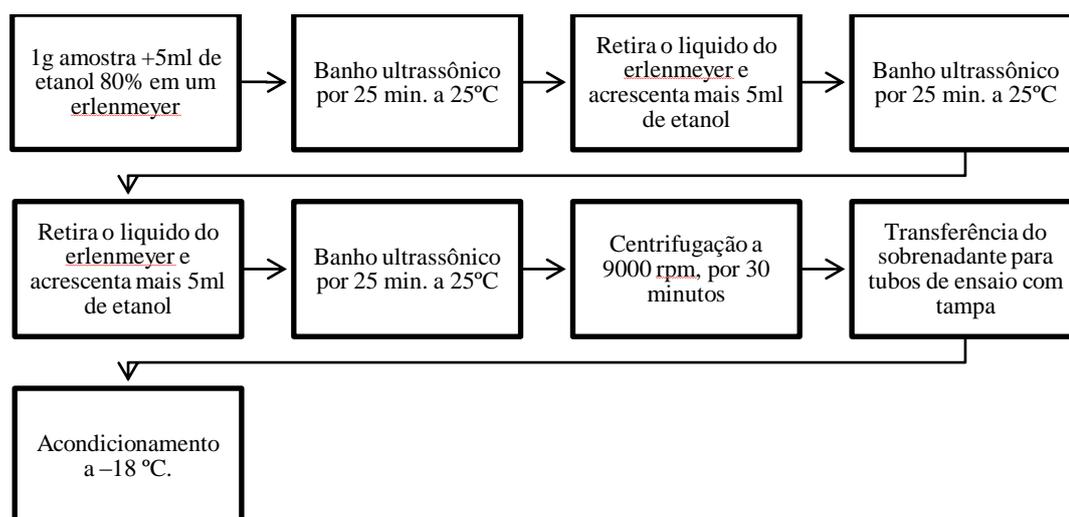


Figura 18. Fluxograma do preparo dos extratos etanólicos de semente e pó de urucum encapsulado. UESB, Itapetinga - BA, outubro de 2012.

3.7 Determinação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais, foi adotado procedimento proposto por Wettasinghe e Shahidi (1999), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC).

Foram homogeneizados em tubos de ensaios 0,5 mL do RFC, 0,5 mL de extrato e 1,0 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). O volume da mistura foi ajustado para 10 mL pela adição de 8 mL de água destilada e submetidos a agitação vigorosa em agitador de tubos. A mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) por 25 minutos e após este tempo, foi centrifugado a 3600 rpm por 5 minutos. A amostra em branco foi constituída de 0,5 mL do RFC, 0,5 mL do solvente correspondente, 1 mL de solução saturada de NaHCO_3 e 8 mL de água destilada. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado a 725 nm em espectrofotômetro.

Para obtenção das curvas analíticas lineares, foi utilizado uma solução estoque de ácido gálico na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, e foram diluídas de modo a obter concentrações de 0,21 até 0,077 mg de equivalente de ácido gálico mL^{-1} . O total de compostos fenólicos nos extratos obtidos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico 100 g^{-1} da amostra desidratada, curvas analíticas com coeficientes de determinação não inferiores a 0,9991.

3.8 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

Para determinação da atividade antioxidante foi utilizado, inicialmente, o método DPPH, contudo, nos ensaios com os extratos etanólicos de urucum, devido à escura coloração dos extratos e a faixa de leitura espectrofotométrica não favorável, os valores foram descartados. Do mesmo modo, no trabalho realizado por Cardarelli e Mercadante (2006), as amostras realizadas pelo método DPPH foram descartadas, sendo então utilizado o método ABTS, neste caso as amostras de urucum apresentaram boa atividade antioxidante.

Diante disso, foi utilizado o método de descoloração do ABTS, de acordo com metodologia proposto por Re et al (1999), com modificações.

Para a realização do ensaio utilizou o cátion radical $\text{ABTS}\bullet+$ (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), que apresenta coloração azul-esverdeada forte. Este radical foi gerado através da reação de ABTS com persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), esta solução foi incubada a temperatura ambiente no escuro, durante 16 horas.

A solução estoque de ABTS●+ foi diluída com tampão fosfato salino (pH 7,2) até o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,02$, determinado em 734 nm.

Foram adicionados 1ml dos extratos etanólicos em duplicata a uma solução contendo 4ml do radical ABTS●+ e as leituras foram efetuadas 5 minutos após o início da reação, em cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico. Quando o composto (amostra) possui capacidade antioxidante, este promove a redução do ABTS●+ pré-formado pela doação de elétron ao radical (recebe H·), o que causa a descoloração da solução e provoca a diminuição na absorbância em 734 nm (Figura 19). A intensidade dessa inibição é dependente da capacidade antioxidante, da concentração e do tempo de reação.

A captura do radical livre foi expresso em porcentagem de inibição (% inibição) do cátion radical ABTS●+, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{\text{branco}} - A_{\text{teste}}}{A_{\text{branco}}} \times 100, \text{ onde:}$$

A_{branco} = absorbância em 734 nm da solução de ABTS●+;

A_{teste} = absorbância em 734 nm da solução de ABTS●+ após 5 min. da adição de 1 ml da solução da amostra.

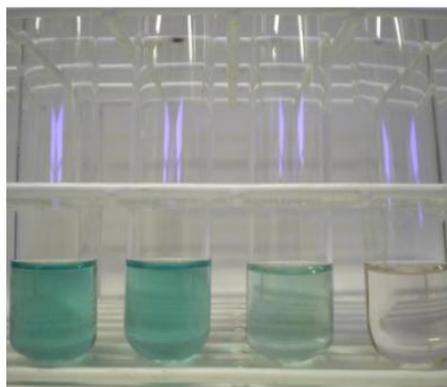


Figura 19. Mudança de coloração pelo sequestro do radical livre ABTS
Fonte: RUFINO et al, 2007

3.9 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o Inteiramente Casualizado (DIC), com dois grupos de três tratamentos:

- três variedades de sementes de urucum *in natura*

- três marcas de produtos de urucum em pó encapsulado.

As análises de determinação de bixina e compostos fenólicos foram realizadas com três repetições. As análises de caracterização físico-química foram realizadas com 2 (duas) repetições.

As análises de atividade antioxidante foram utilizadas um grupo de 6 tratamentos (três variedades de sementes de urucum *in natura* e três marcas de produtos de urucum em pó encapsulado) com duas repetições. Foi utilizado como controle o antioxidante sintético BHT (butil hidroxitolueno).

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), em anexo, e as comparações entre média executados por meio do teste de t student com nível de significância de 5% por meio do programa estatístico SISVAR 4.2. O coeficiente de correlação para determinar a curva padrão de ácido gálico utilizou o software Microsoft Excel, versão 2007.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química

4.1.1 Variedades de urucueiros in natura

Os valores encontrados de umidade, cinzas, lipídeos, proteína bruta e carboidratos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização físico-química das sementes de urucum: umidades, proteína bruta, lipídeos, cinzas e carboidratos totais (valores expressos em porcentagem). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Variáveis	Embrapa 37	Focinho de Rato	Peruana Paulista
Umidade	6,06 ±1,24 ^a	7,01 ± 0,06 ^a	5,91 ±0,97 ^a
Proteína bruta	11,26 ±0,27 ^a	13,23 ±1,22 ^a	11,25 ±0,19 ^a
Lipídeos	13,15 ±0,49 ^a	10,74 ±2,91 ^a	9,62± 1,73 ^a
Cinzas	4,62 ±0,23 ^a	4,15 ±0,12 ^{ab}	3,99 ±0,28 ^b
Carboidratos totais	70,98 ±0,53 ^a	71,89 ± 3,94 ^a	75,15 ±1,93 ^a

As letras diferentes em uma mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

O percentual de umidade das sementes de urucum das variedades Embrapa 37, Focinho de Rato e Peruana Paulista oscilou entre 5,91±0,97 e 7,01±0,06, não apresentando diferença significativa entre eles. Esses valores não se mantiveram distantes dos encontrados por Lemos (2008), que apresentou teores de 4,34 a 6,06% em sementes das variedades Bico de Pato I, CPATU 0060 e Peruana Paulista. A variedade de Peruana Paulista apresentou 5,91% de umidade neste trabalho e 5,58% no trabalho de Lemos (2008). Os pesquisadores Custodio et al (2002) ao trabalhar com germinação de sementes de urucum verificaram teores de umidade que variavam de 6,5 a 7,5%, Corlett, Barros e Villela (2007) encontraram valores entre 7,0 e 9,2%. Em uma pesquisa realizada com 19 amostras de urucum do Instituto Agrônomo de Pindorama em São Paulo, os autores constataram valores de umidade que variavam de 2,86 a 8,56% (OLIVEIRA et al, 2010). Neste último trabalho os valores oscilaram bastante e alguns teores se mantiveram distantes dos encontrados por esse estudo.

De modo geral, o teor de umidade está dentro do limite estabelecido para boas condições de armazenagem, já que sementes de urucum com umidade relativas superiores 14% não são recomendadas, podendo haver incidência de fungos e bactérias.

Os teores de proteína bruta oscilaram entre $11,25 \pm 0,19$ a $13,23 \pm 1,22\%$, não apresentando diferença significativa entre eles. Os valores estão de acordo com os valores encontrados por outros autores. Lemos (2008) quantificou valores médios de 10,37 a 12,37%, Pezzato et al (2004) encontraram 11,50% e Pereira et al (2009) verificaram teor de 13,53%, ambos em semente. Pedrosa, Cirne e Moraes Neto (1999) ao estudar sementes de urucum em diferentes situações de armazenagem encontraram valor médio de 12,67% para proteína. Demczuc Junior (2012) quantificou teores de proteína bruta em resíduo de semente e encontrou valor próximo aos determinados por este trabalho, em torno de 11%.

Os resultados médios de lipídeos oscilaram entre $9,62 \pm 1,73$ e $13,15 \pm 0,49\%$, não apresentando diferença significativa entre eles. Nos trabalhos de Oliveira (2005) e Lemos (2008) os valores encontrados por eles foram 17,5% e 18,38%, respectivamente, sendo superior ao do presente trabalho. Valores inferiores também foram encontrados na literatura, Pereira et al (2009) encontraram 2,10%, Carvalho et al (2010) quantificaram valores de 1,97 a 3,98% e Demczuc Junior (2012), 1,84% para resíduo de semente.

Quanto aos teores de cinzas, os valores oscilaram entre $4,62 \pm 0,23\%$ para a variedade Embrapa 37, $4,15 \pm 0,12\%$ para Focinho de Rato e $3,99 \pm 0,28\%$ para Peruana Paulista. Não houve diferença significativa entre as variedades Embrapa 37 e Focinho de Rato. No entanto, a Embrapa 37 apresentou diferença significativa com a Peruana Paulista. Entre essa última e a variedade Focinho de Rato também não apresentaram diferença entre si. Dentre os trabalhos encontrados na literatura para teores de cinzas, Lemos (2008) quantificou 2,99%, Franco (2007) encontrou 4,6% e Pereira et al (2009), encontraram 6,62%. Demczuc Junior (2012), em análise com o resíduo da semente encontrou 5,65% para resíduo de semente. Os valores apresentam oscilação em comparação a este trabalho.

Os valores de carboidratos totais identificados por diferença variaram entre $70,98 \pm 0,5$ e $75,15 \pm 1,9\%$, não apresentando diferença significativa entre eles. Valor próximo do encontrado por Pereira et al (2009) que foi de 78,02%. No entanto, os valores encontrados por Lemos (2008) e Franco (2007) foram contrastantes, mantendo-se em torno de 58 e 57%, respectivamente. A análise do resíduo da semente realizada por Demczuc Junior (2012) manteve em 27,21%.

Diante dos dados apresentados observa-se uma diferenciação entre os valores apresentados por este trabalho e outros encontrados na literatura, esse fato deve-se a diferenças de variedades trabalhadas e varrições climáticas do cultivo, além de época de colheita.

4.1.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado.

Segue as informações contidas nos rótulos dos produtos encapsulados.

A amostra do urucum em pó encapsulado A apresenta informações incompletas em sua embalagem, já que o rótulo não possui Tabela de Informação Nutricional. O único dado apresentado é a composição: urucum. Quanto à posologia é indicado no rótulo o uso de uma cápsula (500mg) três vezes ao dia para adultos e uma cápsula (500mg) uma vez ao dia para crianças de acordo com indicação do médico ou nutricionista. Diante das informações apresentadas entende-se que o conteúdo da cápsula é inteiramente de urucum em pó.

O urucum em pó encapsulado B apresenta no rótulo informações nutricionais e ingredientes da cápsula (450mg): urucum em pó e vitamina A, além da posologia que indica o consumo de uma cápsula três vezes ao dia. Para esse consumo diário escabele 0,6mg de vitamina A, então uma cápsula corresponde a 0,2mg e 449,8mg de urucum.

O rótulo do urucum em pó encapsulado C apresenta informação nutricional, ingredientes e posologia. Uma porção de uma cápsula (250mg) apresenta 600mcg de vitamina A, ou seja, 0,6mg. Desta forma, 249,4mg do conteúdo seriam de urucum em pó, já que segundo fabricante não há o adicionamento de nenhum outro composto. Neste produto, a posologia indica uma cápsula ao dia e adverte para que o consumo não a exceda.

A caracterização físico-química desses produtos está apresentada na Tabela 7, identificando valores médios de umidade entre $9,79 \pm 0,95$ e $10,70 \pm 0,91\%$, não apresentando diferença significativa entre si. Os valores de proteína bruta oscilaram entre $5,86 \pm 2,73$ e $12,11 \pm 0,41\%$, a marca B apresentou valores significativamente superiores em comparação às demais marcas. Os teores de lipídios encontrados foram entre $12,07 \pm 4,31$ e $18,91 \pm 5,43\%$, não apresentando diferença significativa entre eles. Para cinzas o percentual oscilou de $2,19 \pm 0,94$ a $7,01 \pm 3,12$, não apresentando diferença significativa e para carboidratos totais os valores variaram entre $61,97 \pm 8,12$ para marca B, $79,79 \pm 3,68\%$ a marca A e $74,37 \pm 0,01\%$ a marca C. As marcas A e C foram significativamente superiores ao valor encontrado da marca B.

Tabela 7. Caracterização físico-química do urucum em pó encapsulado, marcas A, B e C. (valores expressos em porcentagem). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Variáveis	Encapsulado A	Encapsulado B	Encapsulado C
Umidade	10,70± 0,91 ^a	9,79±0,95 ^a	10,51±1,01 ^a
Proteína Bruta	5,95± 0,13 ^b	12,11± 0,41 ^a	5,86±2,73 ^b
Lipídeos	12,07±4,31 ^a	18,91±5,43 ^a	17,01±1,01 ^a
Cinzas	2,19± 0,94 ^a	7,01±3,12 ^a	2,76±0,00 ^a
Carboidratos Totais	79,79±3,68 ^a	61,97±8,12 ^b	74,37±0,01 ^a

As letras diferentes em uma mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

Não foram encontrados na literatura, trabalhos voltados à caracterização físico-química de encapsulados de urucum, aqueles encontrados estão relacionados ao comportamento do encapsulante e qualidade de cápsulas.

4.2 Determinação dos teores de bixina

4.2.1 Variedades de urucueiros in natura

Os resultados de pH do presente trabalho foram maiores que 12 o que reforça a ocorrência da reação de saponificação. As amostras não apresentaram diferença significativa para valores de pH, conforme apresentado nas Tabelas 8.

Quanto aos teores de bixina das sementes, a variedade Embrapa 37 se destacou com níveis de bixina mais altos ($4,83 \pm 0,61\%$), sendo significativamente diferentes de todas as outras amostras de sementes (Tabela 8). Essa cultivar é melhorada geneticamente, foi desenvolvida pela EMBRAPA em 2001 e atualmente, possui o maior nível de bixina, podendo chegar muitas vezes a 6%. A variedade utilizada neste trabalho foi coletada na região do Sul da Bahia, município de Eunápolis-BA. A região possui condições climáticas favoráveis, com vegetação predominante de Mata Atlântica, com índice pluviométrico anual. Esses fatos explicam os níveis altos encontrados neste trabalho para essa variedade.

Tabela 8. Teores de bixina e pH nos extratos alcalinos das sementes das variedades de urucum. UESB, Vitória da Conquista - BA, 2012.

Variedades	Bixina(%)	pH dos extratos alcalinos
Embrapa 37	$4,83 \pm 0,61^a$	$12,87 \pm 0,02^a$
Focinho de Rato	$2,35 \pm 0,22^b$	$12,85 \pm 0,04^a$
Peruana Paulista	$2,35 \pm 0,01^b$	$12,85 \pm 0,03^a$

As letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

As variedades Focinho de Rato e Peruana Paulista apresentaram valores para bixina de $2,35 \pm 0,22$ e $2,35 \pm 0,01\%$, não sendo significativamente diferentes entre si, de acordo com a Tabela 8.

Com base nos estudos de Oliveira (1990) as sementes de urucum podem ser classificadas conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Classificação das sementes de urucum.

Classificação	Umidade	Bixina	Material estranho
Tipo 1	<10%	>2,5%	Ausência
Tipo 2	10 a 14%	2,0 a 2,5%	Ausência
Tipo 3	>14%	<1,8%	Presença

Diante dos dados apresentados de teores de bixina e umidades, as sementes da variedade Embrapa 37 enquadra-se na classificação Tipo 1 e Peruana Paulista e Focinho de Rato na Tipo 2.

Outros trabalhos encontrados na literatura realizam análise de bixina em sementes pelo método KOH e encontraram valores próximos. Veríssimo et al (2008) avaliou teores de bixina para variedade Peruana Paulista para tingimento de fibras naturais e quantificou 2,1% do carotenóide. Carvalho et al (2010) quantificaram a bixina de 19 amostras do Instituto Agrônomo de Pindorama-SP e encontrou teores que variavam de 3,12 a 6,26%. Santana et al (2008) ao trabalhar com sementes de Piave Vermelha em diferentes acondicionamentos e temperaturas verificaram teor de bixina de 2,58% e Pedrosa, Cirne e Moraes Neto (1999) encontraram valor médio de 3,37% para sementes de urucum em diferentes situações de armazenagem.

Barbosa-Filho (1998) pesquisou teores de bixina em quatro diferentes genótipo de urucum do estado da Paraíba: Casca Verde (1,3%), Casca Vermelha (1,1%), Bico de Calango (0,07%) e Grão Preto (0,9%) verificando, portanto, valores inferiores ao encontrados neste trabalho e outros na literatura.

Essas oscilações de valores de bixina em diferentes variedades podem ser atribuídas ao fato de que o urucuzeiro é cultivado em áreas com diferentes tipos de clima e em regiões próximas das zonas equatorianas, sugerindo que possa estar associada a fatores climáticos ou edáficos, ou relacionada com fatores genéticos da planta, ou ainda, à interação desses fatores (SÃO JOSÉ, SÃO JOSÉ e REBOUÇAS, 1991).

4.2.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado.

Os percentuais de bixina para urucum em pó encapsulado estão expostos na Tabela 10. A marca B de urucum encapsulado apresentou $1,67 \pm 0,22\%$ de bixina, a marca C apresentou $0,56 \pm 0,21\%$, e a marca A: $0,17 \pm 0,01$. Foram encontradas diferenças significativas para teores

de bixina entre todas as marcas analisadas, no entanto a marca B apresentou o maior teor de bixina.

Tabela 10. Teores de bixina e pH dos extratos alcalinos do urucum em pó encapsulado, marcas A, B e C. UESB, Vitória da Conquista - BA, 2012.

Encapsulado/Marca	Bixina(%)	pH dos extratos alcalinos
A	0,17±0,01 ^c	13,00±0,20 ^a
B	1,67±0,22 ^a	12,79±0,06 ^a
C	0,56±0,21 ^b	12,79±0,06 ^a

As letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

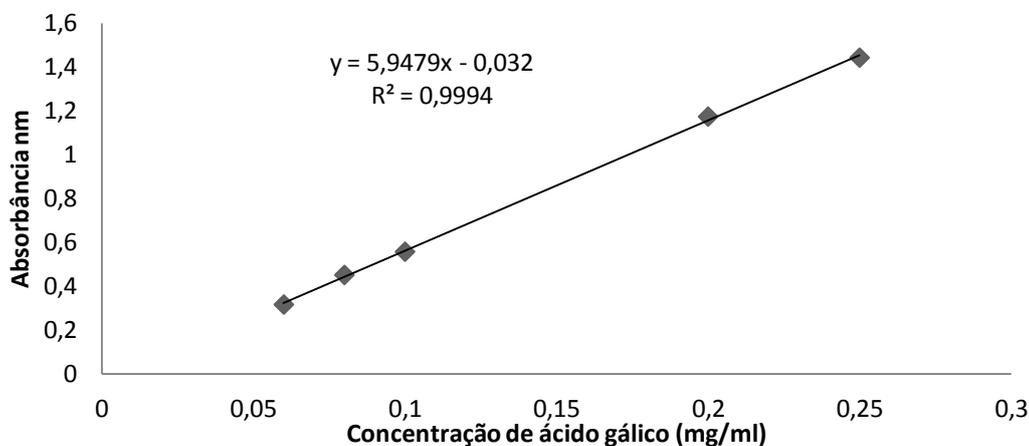
Os valores para bixina foram numericamente maiores para as variedades de sementes do que os produtos encapsulados. Contudo, a variedade da semente Embrapa 37 e a marca B de encapsulado apresentaram maiores teores de bixina.

4.3 Determinação dos fenólicos totais

4.3.1 Variedades de urucueiros in natura

O gráfico 1 apresenta a curva padrão de ácido gálico pela qual foram quantificados os valores de compostos fenólicos com coeficientes de determinação não inferiores a 0,9991.

Gráfico 1. Curva padrão de ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos de urucum *in natura* e encapsulado. UESB, Itapetinga - BA, 2012.



Os teores de fenólicos totais para sementes de urucum variaram de $59,04 \pm 4,9$ mg GAE $100g^{-1}$ para variedade Embrapa 37, $65,13 \pm 2,7$ mg GAE $100g^{-1}$ para Focinho de Rato e $54,84 \pm 8,1$ mg GAE $100g^{-1}$, não havendo diferença significativa entre elas, Tabela 11.

Tabela 11. Teores de Fenólicos Totais nos extratos etanólicos de urucum em semente (valores expressos em mg GAE $100g^{-1}$). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Variedades	Fenólicos (mg GAE $100g^{-1}$)
Embrapa 37	$59,04 \pm 4,91^a$
Focinho de Rato	$65,13 \pm 2,71^a$
Peruana Paulista	$54,84 \pm 8,12^a$

A s letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

Trabalhos realizados com sementes de urucum revelaram valores superiores aos encontrados neste estudo. Lemos (2008) verificou valores entre 297,80 a 450,97 mg GAE

100g⁻¹ de fenóis totais para extratos etanólicos. Cardarelli e Mercadante (2006) encontraram teores para extratos etanólicos de 109,8 mg GAE 100g⁻¹ e 156,5 mg GAE 100g⁻¹ para hidroálcoolicos.

Os valores encontrados são discordantes daqueles citados pela literatura, esse fato se deve provavelmente, pela diferença das variedades utilizadas e as condições climáticas envolvidas, além da época de colheita das sementes.

4.3.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado.

De acordo com a Tabela 12, os teores de fenólicos em extratos etanólicos do urucum encapsulado, a marca B apresentou valor de 49,80±7,5mg GAE 100g⁻¹, significativamente superior as demais variedades. Sendo os valores das marcas A e C, 22,58±1,6 e 27,47±5,3 mg GAE 100g⁻¹, respectivamente.

Tabela 12. Teores de Fenólicos Totais nos extratos etanólicos de urucum encapsulado (valores expressos em mg GAE 100g⁻¹). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Encapsulado/Marca	Fenólicos (mg GAE 100g ⁻¹)
A	22,58±1,61 ^b
B	49,80±7,51 ^a
C	27,47±5,33 ^b

As letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student (p < 0,05).

A marca B apresentou maior teor do carotenóide bixina e também maior valor de compostos fenólicos. Esses dados sugerem uma superioridade da marca B sob as demais.

Não foi encontrado na literatura estudos que quantificaram teores de fenóis totais em corantes de urucum microencapsulados. No entanto, com base nos resultados das variedades *in natura*, os valores dos fenóis dos encapsulados são numericamente inferiores.

Os teores de compostos fenólicos estão relacionados ao potencial antioxidante de vegetais.

4.4 Avaliação da atividade antioxidante por ABTS

4.4.1 Variedades de urucueiros in natura

As sementes de urucum possuem compostos bioativos, como compostos fenólicos e carotenóides entre eles a bixina e norbixina que possui pela sua estrutura química um potencial antioxidante, que por muitas vezes já foi alvo de investigação de diversos autores.

A Tabela 13 apresenta o percentual de inibição do radical livre ABTS dos extratos etanólicos das sementes de urucum. Utilizou-se o antioxidante sintético BHT como controle. A variedade Embrapa 37 apresentou 84,99 ±1,01% de inibição, Focinho de Rato 82,46 ±1,43% e Peruana Paulista 72,51±1,15%. Não houve diferença significativa entre os extratos das diferentes variedades e o controle.

Tabela 13. Percentual de Inibição do radical livre ABTS em extratos etanólicos de sementes de urucum e o controle BHT (antioxidante sintético). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Amostras	% inibição do ABTS
BHT (antioxidante sintético)	63,62±0,11 ^a
Embrapa 37	84,99 ±1,01 ^a
Focinho de Rato	82,46 ±1,43 ^a
Peruana Paulista	72,51±1,15 ^a

As letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student (p < 0,05).

A ação antioxidante das sementes de urucum pode ser confirmada por trabalhos como o de Martínez-Tomé et al (2001) que realizaram um estudo de atividade antioxidante com especiarias, entre elas colorau (*Bixa orellana*), orégano (*Origanum vulgare*) e açafrão (*Crocus sativus*) e também com antioxidantes sintéticos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e propil galato, os ensaios apresentaram boas atividades antioxidantes as especiarias e em alguns testes superior ao antioxidante sintético.

Em concordância ao presente trabalho em que as amostras de urucum apresentaram altos índices de atividade antioxidante, Silva e Takemura (2006) realizaram ensaios para atividade antioxidante com extratos de *Vermania condensata*, *Bixa orellana* e *Alternanthera brasiliana*. As espécies de *V. condensata*, *B. orellana* mostraram significativa atividade antioxidante, enquanto o extrato de *A. brasiliana* apresentou pouca atividade.

Kiokias e Oreopoulou (2006) ao avaliarem individualmente o extrato de urucum, luteína e licopeno quanto a suas capacidades de inibir a formação de hidroperóxidos em uma emulsão aquosa, cuja oxidação foi estimulada pelo uso do 2,2'-azobis amidinopropano (AAPH), foi evidenciada alta atividade antioxidante pelo urucum em comparação aos outros compostos, concordando com os resultados encontrados no presente estudo.

Lemos (2008) realizou teste de atividade antioxidante como genótipos de urucum através do método ácido linoleico/b-caroteno e encontrou valores entre 18,91 a 35,26% de inibição. Já no presente trabalho, os extratos de urucum superaram as variedades de urucum utilizadas por Lemos (2008), chegando a atingir até 84,99% de inibição aos radicais livres.

Cristié (2011) avaliou a atividade antioxidante de urucum e piquiá. O urucum apresentou 63,6% de proteção ao aminoácido triptofano contra o oxigênio singlete, uma espécie reativa. Percentual mais baixo que o encontrado no presente trabalho.

Oliveira Neto et al (2012) verificou atividade antioxidante através do método DPPH com extratos de urucum, beterraba e acerola. O urucum apresentou maior atividade antioxidante em comparação aos demais. Os autores acreditam que a ação antioxidante do urucum se deve aos compostos fenólicos, mas também em grande parte aos carotenóides presentes no pigmento.

Outro ensaio realizado pelo método DPPH foi realizado com extratos brutos de folhas de urucum e espinheira santa, ambos os extratos apresentaram elevada atividade antioxidante, 91,6% para urucum e 90,1% para espinheira santa (GOMES et al, 2008).

Os estudos apresentados corroboram com os resultados do presente trabalho, em que as amostras de *Bixa orellana* mostraram alto percentual de inibição a radicais livres.

4.4.2 Marcas de produtos de urucum em pó encapsulado.

Utilizou-se o antioxidante sintético BHT como controle. O percentual de inibição do radical ABTS pelos extratos etanólicos das amostras de pó de urucum encapsuladas apresentou valores altos, o urucum encapsulado da marca A quantificou 86,80±0,93%, a marca B 98,41±0,23%, e marca C 94,73±0,12% (Tabela 14), havendo diferença significativa entres as três marcas e o controle.

Tabela 14. Percentual de Inibição do radical livre ABTS em extratos etanólicos de urucum em pó encapsulado A, B e C e controle BHT (antioxidante sintético). UESB, Itapetinga - BA, 2012.

Encapsulado/Marca	% inibição do ABTS
BHT (antioxidante sintético)	63,62±0,11 ^d
A	86,80±0,93 ^b
B	98,41±0,23 ^a
C	94,73±0,12 ^c

As letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença estatística entre si pelo teste de t student ($p < 0,05$).

O produto encapsulado da marca B apresentou valores significativamente mais altos para bixina, compostos fenólicos e atividade antioxidante que as outras marcas analisadas. Esse produto apresentou teor de antioxidante superior ao do antioxidante sintético. Esses resultados demonstram que o produto da marca B é de qualidade superior que as demais, visto que os compostos bioativos apresentam altos valores, além disso, esse produto se diferencia dos outros pela particularidade da cápsula ser de material escuro, evitando a oxidação das substâncias. Esses dados podem justificar o valor unitário (R\$ 27,00) do frasco da marca B ser superior aos demais.

Em trabalhos encontrados na literatura, não foi encontrado estudos com ensaios de atividade antioxidante de urucum em pó encapsulado. Ainda assim, nota-se que o potencial de inibição desse radical é alto mesmo após o processamento das sementes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O urucum é visto como alimento funcional, e muito procurado como produto fitoterápico.

Devido às propriedades funcionais presentes na espécie *Bixa orellana* sugere-se uma substituição dos corantes sintéticos pelo corante de urucum, já que esse corante é um produto natural, benéfico à saúde humana.

Contudo este trabalho conclui que:

- Os produtos encapsulados apresentaram menor teor de bixina quando comparado com as variedades de sementes. Sendo a variedade Embrapa 37 com o maior índice de bixina.

- Não houve diferença dos valores de composição físico-química nas cultivares de sementes, com exceção dos valores de cinzas e marcas de encapsulados, com exceção dos teores de proteína bruta.

- Não houve diferença de compostos fenólicos nas cultivares de sementes, no entanto a marca B de urucum em pó encapsulado apresentou maior índice de compostos fenólicos quando comparados as demais marcas.

- As sementes de urucum e os produtos encapsulados em pó mostraram potencial antioxidante para captura de radical livre ABTS, os valores de atividade de antioxidante de *Bixa orellana* foram maiores do que as do antioxidante sintético BHT (hidroxitolueno butilado).

Tais resultados sugerem que a utilização de corantes de urucum pode proporcionar uma ação preventiva de doenças contribuindo de forma benéfica à saúde do ser humano.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M. H.; SINGH R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v.90, p.891-896, 2005.
- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, 2004. 1359p.
- ALVES, R. W. **Extração e Purificação de Corantes de Urucum**. Florianópolis, 2001. 158p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).
- ANVISA- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, Disponível em:<<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=14796&word=>>Acessado em 12/04/11.
- AOAC- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Arlington: AOAC, v. 2, cap. 39, p.13-15, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. – Viçosa: UF, 2004.335p.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA-FILHO, R. N.; LIRA, B. F. et al. Teores de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* no cultivadas Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7/8, p. 41-47, 1998.
- BATISTA, F. A. S. **Urucueiro**: instruções práticas para implantação e condução de um plantio, João Pessoa: EMEPA-PB/EMATER-PB, 1988. 26p. (EMEPA-PB/EMATER-PB. Circular Técnica, 3).
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12(2): 123-130, mai./ago., 1999.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992b. 238p.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P.A **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 1992a. 143p.
- BOUVIER, F.; SUIRE, C.; MUTTERER, J.; CAMARA, B. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. **Plant Cell**, v. 15, p. 41-62, 2003a.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003b.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.

BURNS, R. E.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D. B. et al Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolics content of red wines. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 48 (2): 220-30. 2000.

CARDARELLI, C. R.; MERCADANTE, A. Z. Propriedades Antioxidantes e de Cor de Extratos de Urucum. **Congresso Interno de Iniciação Científica**. UNICAMP: Campinas, 2006.

CARVALHO, P. G. B. de; MACHADO, C. M. M; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. de N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**. [online]. 2006, vol.24, n.4, pp. 397-404.

CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G. da; FABRI, E. G. et al. Concentração de Bixina e Lipídios em Sementes de Urucum da Coleção do Instituto Agrônômico (IAC). **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p519-524, 2010.

CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALESI, I. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. H.; BENCHIMOL, R. L.; VENTURIERI, M. M. . **A Cultura do Urucum**. 2ª. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 61p .

CASTRO, M. S. **Influência das variáveis Operacionais no Processo de Secagem de Urucum**. Monografia DEQ/UFPA, Belém, p.90, 1992.

CLARK, J. P. Food encapsulation: capturing ane substance by another. **Products & Technologies Processing**, v.56, n.11, p.63-65, nov. 2002.

COELHO, A. M. S. P.; SILVA, G. A.; VIEIRA, O. M. C.; CHAVASCO, J. K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana*L. (Urucum). **Revista Lecta**, 21 (1/2), 47-54. 2003.

COLLI, C. **Nutracêutico é uma nova concepção de alimento**. Notícias SBAN 1998;1:1-2.

CORLETT, F. M. F.; BARROS, A. C. S.A.; VILLELA, F. A. Qualidade fisiológica de sementes de urucum armazenadas em diferentes ambientes e embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**; v. 29, n. 2, p. 148-158. Ago. 2007.

COSTA, C. K. **Estudo Fitoquímico de *Bixa Orellana* L., Bixaceae e Aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética**. 2007. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

CRISTIÉ, R. C. **Avaliação da extração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e corantes presentes em urucum e piquiá**. Campinas-SP. 2011.Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), UNICAMP.

CUSTODIO, C. C.; MACHADO-NETO, N. B.; CASEIRO, R. F.; IKEDA, M., BONFIM, D. C. Germinação de Sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.), **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p.197-202, 2002.

DEMCZUK JUNIOR, B. **Estabilidade e aplicação do corante de urucum no estado do Paraná** Curitiba, 2012. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação in vitro da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 17, n. 4, p. 74-78, jul./ago. 2005.

DINIZ, A. C. B. D.; ASTARITA, L. V., SANTAREM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 443-450, 2007.

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Novas Cultivares de urucum**: Embrapa 36 e Embrapa 37. Circular Técnica nº22, jun., 2001.

ENGELHARDT, J.; ROED, B. L.; DIDRIKSEN, C. Annatto the natural color of choice in modern food industry. **Natcol. Quart. Inf. Bull**, v.2, p.4-10, 1988.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in Foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 57-139, 2001.

ESTEVE, M. M.; KRIESTEN, R. M. Estudo de um complexo ativo para prevenção do envelhecimento cutâneo. **Cosmetics & Toiletries**, v. 2, n.1, jan./fev., p. 31-40, 1990.

FALESI, I. C. **Urucuzero: Recomendações básicas para o seu cultivo**. UAPAE de Belém, EMBRAPA, p.12, 1987.

FIGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. **Acta Botânica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C.; FILHO, J. C.; NETO, M. B.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINELLI, I. E. C. **Urucuzero agronegócios de corantes naturais**. João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. 120 p.

FRANCO, C. F. de O. O Agronegócio do Urucum na Região Nordeste. **1ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva de Urucum. 2007**. CD-Rom.

GOMES, M. F.; SILVA, V. T. B.; LAVERDE Jr, A.; TAKEMURA, O. S. Avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Arquivos Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 169-173, set./dez. 2008.

GUERRA FILHO, S. S.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries**, v. 6, n. 2, p. 51-54, mar./abr., 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ª ed. New York: Oxford, 1999.

HARBORNE, J. B. **Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1994.

HARBORNE, J. B., BAXTER, H., MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2ª ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v.13. n.19/20, p.894-901, 2008.

IAL- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IAL, 1985, v.1, 371p.

IROBI, O. N.; MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W.A. Antimicrobial activity of annatto (*Bixa orellana* L.) extract. **Pharmaceutical Biology**, v.34, n.2, p.87-90, 1996.

JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D.W.; PELCHER, L.E.; COVELLO, P.S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v.163, p.141-145, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991, 777p.

KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 50 (2): 213-8, 1999.

KIOKIAS, S.; OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.7, p.132-139, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856406000191>>. Acesso em: 16 mar. 2010.

LE MOS, A. R. **Atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.)** Itapetinga-BA. 2008, 65p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, A. S., LIMA, E. Q. e SILVA, J. F. Toxicidade Aguda de Rutina e de *Bixa orellana*., **Acta farmaceutica bonaerense**, 22 (1), 21-26, 2003.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429-438.
- MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.
- MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Caracterização de um Novo Carotenóide Minoritário de Urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(2): 193-196, maio-ago, 2001.
- MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry** v. 2, p. 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1050-1054, 1997.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.577-599, 2000.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. **Nitric oxide**: role in human disease. Encyclopedia of Life Sciences, 2001. Disponível em:< www.els.net> Acesso em: 20 de ago. 2012.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 2005.
- MORAIS, O. M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H. ATAIDE, E. M. Melhoramento genético Del achiote em Brasil. Revista Brasileira de Corantes Naturais, Vitória da Conquista, BA, v.3, n.1, p.109-111, 1999.
- MULLER, G. The legal situation relating to the colouring of foodstuffs in the federal Republic of Germany. Natcol. Quart. Inf. Bull., v.3, p.4-8, 1988.
- NACHTIGALL, A. M.; SILVA, P. I.; BERTOLDI, M. C.; STRINGHETA, P. C. Estudo da Saponificação em Pigmentos de Urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(4): 873-878, out./dez., 2009.
- NAZARÉ, R. F. R.; KUSUHARA, K.; BARBOSA, W. C. B.; ALVES, S. M.; MARTINS, S.; RODRIGUES, I. A. Estudos para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora Amazônica. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.2, n.1, p.157-165, 1996.
- NOVAES, A. B.; SÃO JOSÉ, A. R. Caracterização da região de Mata de Cipó no Sudoeste da Bahia. In: NOVAES, A. B.; SÃO JOSÉ, A. R.; BARBOSA, A. A.; SOUZA I. V. B. **Reflorestamento no Brasil**, Vitória da Conquista, BA, UESB, 1992. p.07-16.
- ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**, Amsterdam, v.386, n.1, p.39-67, 1997.

OLIVEIRA NETO, F. B.; FREIRE, L. C. C.; XAVIER, A. R. F. et al de Estudo Químico de plantas do Rio Grande do Norte: Avaliação do teor de fenóis e atividade antioxidante. **VII Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Palmas, TO, 2012.

OLIVEIRA, A. C. A. X.; SILVA, I. B.; MANHÃES-ROCHA, D. A.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Induction of liver monooxygenases by anatto and bixin in females rats. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, p.113-118, 2003.

OLIVEIRA, J. S. de. **Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.)** Florianópolis, 2005. 215p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina.

OLIVEIRA, V. P. Melhoramento genético do urucuzeiro – uma visão do setor produtivo. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.2, n.1, p.1-6, 1996.

OLIVEIRA, V. P. Tratos culturais do Urucum. In: SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H. **A cultura do urucum no Brasil**. Vitória da Conquista - BA: UESB, 1990, p.46-49.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**, 100 (2): 579-83. 2007.

PEDROSA, J. P.; CIRNE, L. E. da M. R.; MORAES NETO, J. M. Teores de Bixina e Proteína em Sementes de Urucum em Função do Tipo e do Período de Armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.3, n.1, p.121-123, 1999 Campina Grande, PB, DEAg/UFPB.

PEREIRA, E. S. A; REGADAS FILHO, J. G. L.; FREITAS, R. B.; NEIVA, J. N. M.; CÂNDIDO, M. J. D. Valor Energético de Subprodutos da Agroindústria Brasileira. **Archivos de Zootecnia**, 58 (223): 455-458. 2009.

PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C. de.; BARROS, M. M.; PINTO, L. G. Q.; FURUYA, W. M. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, p. 329-337, 2004.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela; 2005.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação de métodos de obtenção e de estabilidade de pigmentos de sementes de urucum**. Viçosa –MG, 1995. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PORTER, L.G.T. In: Harborne, J. B. **Methods in plant biochemistry: Plant phenolics**. London: Academic Press, 1989. p.389-419.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v.5, p.47-56, 1980.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNAL, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do urucum: Práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista -BA. DFZ/UESB/CBCN, 1996. 120p.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968.

ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition** 88: S133-S138, 2002. (Suppl. 2).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin american food sources of carotenoids, **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, p. 74- 84, 1999.

RUFINO, M. do S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. da; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico**. Comunicado Técnico EMBRAPA. n. 126: Fortaleza, 2006.

RUFINO, M. do S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S et al, Metodologia Científica: **Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+**. Comunicado Técnico EMBRAPA. n. 126: Fortaleza, 2007.

SANDI, M. P., CUEN, M. BACERRA, R. El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **Biodiversitas**, Ano 7, nº46, 7-11, enero 2003.

SANTANA, K. da C.; GUEDES, P. de A.; REBOUÇAS, T. N. H. et al. Teores de bixina em urucum (Bixa orellana) 'Piave Vermelha', em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.2, n.1, p.19-22, mar. 2008.

SANTOS, E. **O urucu**. Ministério da Agricultura. 1958, 14p. (Serviço de Informação Agrícola, 818).

SANTOS, J. A. B. dos. **Análise comparativa entre técnicas de processamentos para extração de pigmentos nas sementes de urucum**. Campina Grande–PB, 2007, 167p. Tese (Engenharia de Processos) Universidade Federal de Campina Grande.

SANTOS, L. P. **Caracterização química e avaliação da propriedade antioxidante de diferentes variedades de uva**. Maringá 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Maringá.

SÃO JOSÉ, A. R.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. R. Aspectos técnicos da cultura do urucuzeiro. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos, 2, e Simpósio Internacional de Urucum**, 1991. Campinas, SP.: ITAL, p.135-140, 1991.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Sciences Technology**, v. 40, n. 2, p. 131-141, 2003.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International**,25:1058-71, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Editora UFV: Viçosa-MG, 2002. 235p.

SILVA, F. C. P.; FRANCO, C. F. O. **Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio**. João Pessoa: EMEPA-PB, 2000, 15p.

SILVA, P. I. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2007. 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C. Fatores que Influenciam a Reação de Saponificação dos Pigmentos do Urucum. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 33, Edição Especial, p.1892-1897, 2009.

SILVA, V. T. B.; TAKEMURA, O. S. Determinação da Atividade Antioxidante de Extratos Hidroalcoólicos de *Vernonia condensata* (Asteraceae), *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, 2006.

SISVAR-SISTEMA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA. Versão 4.2, Lavras: UFLA, 2003.

SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**,1992. 70:3562-3577.

SOARES, V.L.F.; RODRIGUES, S.M.; OLIVEIRA, T.M.; QUEIROZ, T.O.; LIMA, L.S.; HORA-JÚNIOR, B.T.; GRAMACHO, K.P.; MICHELI, F.; CASCARDO, J.C.M.; OTONI, W.C.; GESTEIRA, A.S.; COSTA, M.G.C. Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 1329-1340, 2011.

SOUSA, M. S. M. Ativos microencapsulados encontram mais aplicações. **Revista Química e Derivados**, nº 388, nov., 2000.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, p.S14-S18, 1997. Supplement 2.

STRINGHETA, P. C. Compostos Bioativos em Alimentos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 2004. Disponível em:
<http://www.biotecnologia.com.br/biochat/artigos/artigo.asp?id=50>. Acesso em 14/10/2012

TAKAMURA, O. S. Editorial: Tendências no estudo de Plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v.12, n.3, p.165-274, set./dez. 2008.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e Determinação, por CLAE, de Bixina e Norbixina em Coloríficos, **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(3): 310-313, set./dez. 2001.

VERRISSIMO, S. A.; OLIVEIRA, E. L. de O.; LADCHUMANANANDASIVAM, R. et al Aproveitamento do corante natural (*Bixa orellana*) no tingimento de fibra celulósica. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p.35-39, 2008.

VOEGELI, R.; MEIER, J.; DOPPLER S.; RIES, P. Defesa contra espécies reativas de oxigênio: modelos in vitro. **Cosmetics & Toiletries**, v. 4, n. 5, p. 49-55, set./out. 1992.

WAGNER, H. Pesquisa Fitomédica no novo milênio: Tendências e mudanças. In: YUNES, R. A. ; CECHINEL FILHO, V. **Química dos produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacongosia**. 2007, 35-47p.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.

WEISS J. F.; LANDAUER M. R. Protection Against Ionizing Radiation by Antioxidant Nutrients and Phytochemicals. **Toxicology**, 189, p.1-20, 2003.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Avaliação dos Métodos Analíticos para Determinação da Bixina em Grãos de Urucum e suas Correlações. In: **Seminário de Corantes Naturais para Alimentos e Simpósio Internacional de Urucum**, Campinas, Anais. ITAL, p.275-279, 1991.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**74: p.139-161, 1994.

ZHANG, L. X.; COONEY R. V.; BERTRAM J. S. Carotenoids Gap Junction Communication and Inhibit Lipid Peroxidation in C3H/10T1/2 Cells: Relations to Their Cancer Chemopreventive Action. **Carcinogenesis**, v 12, p. 2109-2114, 1991.

ANEXO A

Tabela de análise de variância para variável lipídeo em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	13.015600	6.507800	1.744	0.3145
erro	3	11.197800	3.732600		
Total corrigido	5	24.213400			
CV (%) =	17.30				
Média geral:	11.1700000		Número de observações:	6	
Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA					
DMS: 6.14845028587726 NMS: 0.05					

ANEXO B

Tabela de análise de variância para variável proteína em sementes de urucum *in natura*.
UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	5.200933	2.600467	5.588	0.0974
erro	3	1.396150	0.465383		
Total corrigido	5	6.597083			
CV (%) =	5.73				
Média geral:	11.9083333		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 2.17102764162376 NMS: 0.05

ANEXO C

Tabela de análise de variância para variável umidade em sementes de urucum *in natura*.
UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	1.428700	0.714350	0.892	0.4966
erro	3	2.402450	0.800817		
Total corrigido	5	3.831150			
CV (%) =	14.15				
Média geral:	6.3250000		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 2.8479115147459 NMS: 0.05

ANEXO D

Tabela de análise de variância para variável carboidrato em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	19.229733	9.614867	1.454	0.3618
erro	3	19.832200	6.610733		
Total corrigido	5	39.061933			
CV (%) =	3.54				
Média geral:	72.6733333		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 8.18247636172857 NMS: 0.05

ANEXO E

Tabela de análise de variância para variável cinzas em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	0.428933	0.214467	9.172	0.0527
erro	3	0.070150	0.023383		
Total corrigido	5	0.499083			
CV (%) =	3.60				
Média geral:	4.2483333		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 0.486645991336263 NMS: 0.05

ANEXO F

Tabela de análise de variância para variável fenóis em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRAS	2	160.612200	80.306100	2.485	0.1636
erro	6	193.910000	32.318333		
Total corrigido	8	354.522200			
CV (%) =	9.53				
Média geral:	59.6733333	Número de observações:	9		

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRAS

DMS: 11.358014045571 NMS: 0.05

ANEXO G

Tabela de análise de variância para variável bixina em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRAS	2	4.763756	2.381878	17.213	0.0033
erro	6	0.830267	0.138378		
Total corrigido	8	5.594022			
CV (%) =	12.99				
Média geral:	2.8644444		Número de observações:	9	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRAS

DMS: 0.743209238246985 NMS: 0.05

ANEXO H

Tabela de análise de variância para variável atividade antioxidante em sementes de urucum *in natura*. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	3	576.281100	192.093700	2.478	0.2006
erro	4	310.057300	77.514325		
Total corrigido	7	886.338400			
CV (%) =	11.60				
Média geral:	75.8950000		Número de observações:	8	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 24.4447972944758 NMS: 0.05

ANEXO I

Tabela de análise de variância para variável lipídeo em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	49.866133	24.933067	1.519	0.3503
erro	3	49.252800	16.417600		
Total corrigido	5	99.118933			
CV (%) =	25.33				
Média geral:	15.9966667		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 12.8948048856134 NMS: 0.05

ANEXO J

Tabela de análise de variância para variável proteína em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	51.426900	25.713450	10.092	0.0465
erro	3	7.643850	2.547950		
Total corrigido	5	59.070750			
CV (%) =	20.02				
Média geral:	7.9750000	Número de observações:	6		

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 5.07990266150973 NMS: 0.05

ANEXO L

Tabela de análise de variância para variável umidade em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	0.918233	0.459117	0.755	0.5426
erro	3	1.824650	0.608217		
Total corrigido	5	2.742883			
CV (%) =	7.55				
Média geral:	10.3316667		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 2.48192754139729 NMS: 0.05

ANEXO M

Tabela de análise de variância para variável carboidrato em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	333.792533	166.896267	16.148	0.0248
erro	3	31.005400	10.335133		
Total corrigido	5	364.797933			
CV (%) =	4.46				
Média geral:	72.0433333		Número de observações:	6	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 10.2309975787921 NMS: 0.05

ANEXO N

Tabela de análise de variância para variável cinzas em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	2	27.686100	13.843050	4.001	0.1424
erro	3	10.380250	3.460083		
Total corrigido	5	38.066350			
CV (%) =	46.68				
Média geral:	3.9850000	Número de observações:	6		

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 5.9197479970498 NMS: 0.05

ANEXO O

Tabela de análise de variância para variável fenóis em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRAS	2	1263.353156	631.676578	21.902	0.0017
erro	6	173.046067	28.841011		
Total corrigido	8	1436.399222			
CV (%) =	16.13				
Média geral:	33.2844444	Número de observações:	9		

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRAS

DMS: 10.7295909229958 NMS: 0.05

ANEXO P

Tabela de análise de variância para variável bixina em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRAS	2	3.590067	1.795033	60.803	0.0001
erro	6	0.177133	0.029522		
Total corrigido	8	3.767200			
CV (%) =	21.57				
Média geral:	0.7966667		Número de observações:	9	

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRAS

DMS: 0.343283117774922 NMS: 0.05

ANEXO Q

Tabela de análise de variância para variável atividade antioxidante em urucum em pó processado. UESB, Vitória da Conquista, 2012.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	3	1463.530838	487.843613	2165.187	0.0000
erro	4	0.901250	0.225312		
Total corrigido	7	1464.432088			
CV (%) =	0.55				
Média geral:	85.8912500	Número de observações:	8		

Teste t (LSD) para a FV AMOSTRA

DMS: 1.31791711735565 NMS: 0.05
