

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA APARECIDA MIRANTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIMICROBIANA DE URUCUM (*Bixa
orellana*) ENCAPSULADO E *IN NATURA***

TOLEDO

2022

JULIANA APARECIDA MIRANTE DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIMICROBIANA DE URUCUM (*Bixa orellana*) ENCAPSULADO E *IN NATURA*

Physico-chemical and antimicrobial characterization of annunto (*Bixa orellana*) encapsulated and *in natura*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Patricia Dayane Carvalho Schaker.

TOLEDO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JULIANA APARECIDA MIRANTE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIMICROBIANA DE URUCUM (Bixa
orellana) ENCAPSULADO E *IN NATURA***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Patricia Dayane Carvalho Schaker.

Data de aprovação: 24 de junho de 2022

Thiago Cintra Maniglia
Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Cleverson Busso
Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**TOLEDO
2022**

Dedico esse trabalho ao meu pai,
que além do meu maior
incentivador era o homem
que sonhou com esse momento

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais que são os responsáveis pela minha formação, dando apoio financeiro e emocional durante toda essa jornada e principalmente ao meu pai que onde ele estiver sei que está olhando e guardando por mim. A minha família que ajudou em todos os momentos desse ciclo, nas idas e vindas pra casa, levando e trazendo objetos necessários e todo o apoio.

Aos meus queridos amigos Bruna Bohm, Diego Assunção, Maria Heiss e Marina Cunha, pela amizade sincera e por terem se tornado uma segunda família dentro da graduação, onde estudamos, choramos, rimos e crescemos juntos. Aos novos amigos que chegaram a pouco tempo, mas que foram extremamente importantes nessa reta final de curso, Matheus Minely, Karina Americo, que tornaram os dias mais leves e alegres.

Agradeço a minha orientadora Prof.(a) Dr.(a) Patricia Dayane Carvalho Schaker, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória, apoio e dedicação. Ao grupo de pesquisa orientado pela professora, pois sem eles esse trabalho teria sido muito mais difícil.

A Coordenação de Curso, pela cooperação.

A equipe do laboratório multiusuário do campus Toledo que auxiliou na utilização dos equipamentos e cederam o espaço para que fosse realizada a pesquisa.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A demanda dos consumidores por um estilo de vida mais saudável, vem promovendo o crescimento do mercado de nutracêuticos. O urucum (*Bixa orellana L*) é uma planta de origem amazônica que produz em suas sementes um pigmento de coloração vermelha, com vasto uso na indústria como corante. Essa planta também tem sido reconhecida pelo seu potencial de produção de moléculas bioativas com atividade antioxidante, que podem ser utilizadas para proteção contra o câncer, problemas cardiovasculares e envelhecimento. Uma forma de consumir esses produtos naturais com bioatividade é por meio dos encapsulados, que visam aumentar a vida útil do produto. No entanto, a composição dos produtos encapsulados pode afetar o conteúdo de compostos bioativos presentes, tendo implicações nos efeitos desejados pelo seu consumo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar sementes de urucum *in natura* e produtos de urucum encapsulados, vendidos como nutracêuticos, quanto às propriedades físico-químicas, teor de bixina, potencial antioxidante, e atividade antimicrobiana, a fim de verificar diferenças nas propriedades de interesse entre os diferentes produtos, sendo uma amostra *in natura* (A1) e tres encapsuladas (A2, A3 e A4). As amostras apresentaram teores de umidade variando de 7,82 a 11,96%, valores que dificultam a deterioração microbiana do produto. A análise de cinzas indicou a presença de impurezas na amostra encapsulada A2. Na análise de lipídeos, todas as amostras apresentaram valores baixos variando de $0,55 \pm 0,03$ a $1,31 \pm 0,03\%$, e para o teor proteico, as amostras apresentaram valores inferiores ao encontrados na literatura entre $1,94 \pm 0,01$ e $2,47 \pm 0,14\%$, possivelmente devido à metodologia empregada, O teor de bixina, composto bioativo em maior abundância no urucum, foi superior na amostra *in natura* (A1) com um valor de $1,14 \pm 0,03\%$. A amostra *in natura* também apresentou resultados superiores para quase todas as análises antioxidantes, exceto flavonoides, na qual o encapsulado A4 obteve a maior concentração, sendo a amostra de encapsulados que melhor se destacou nas atividades antioxidantes. Na análise do potencial antimicrobiano somente a amostra de urucum *in natura* apresentou a capacidade de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*, com um valor de CMI de $417,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não sendo capaz de inibir o crescimento da bactéria *E. coli*. Com os resultados obtidos no presente trabalho, o encapsulado que se destacou foi o A4, sendo, portanto, o mais indicado para o consumo, caso não seja possível o consumo da amostra *in natura*. Além disso, pelos resultados obtidos fica evidente que deve-se considerar a composição do produto para escolha pelo consumidor a fim de garantir os benefícios esperados pelo seu consumo.

Palavras-chave: composição centesimal; antioxidantes; antimicrobianos, bixina.

ABSTRACT

Consumer demand for a healthier lifestyle has been promoting the growth of the nutraceuticals market. Annatto (*Bixa orellana* L) is an Amazonian plant that produces a red pigment in its seeds, widely used in the industry as a dye. This plant has also been recognized for its potential to produce bioactive molecules with antioxidant activity, which can be used to protect against cancer, cardiovascular problems and aging. One way to consume these natural products with bioactivity is through encapsulated products, which aim to increase the shelf life of the product. However, the composition of encapsulated products can affect the content of bioactive compounds present, having implications for the desired effects of their consumption. Thus, the objective of this work was to characterize *in natura* annatto seeds and encapsulated annatto products, sold as nutraceuticals, in terms of physicochemical properties, bixin content, antioxidant potential, and antimicrobial activity, in order to verify differences in the properties of interest between the different products, one sample *in natura* (A1) and three encapsulated (A2, A3, and A4). The samples have moisture contents ranging from 7.82 to 11.96%, values that make the microbial deterioration of the product difficult. Ash analysis indicated the presence of impurities in the encapsulated sample A2. In the analysis of lipids, all samples presented low values ranging from 0.55 ± 0.03 to $1.31 \pm 0.03\%$, and for the protein content, the samples presented values lower than those found in the literature between 1.94 ± 0.01 and $2.47 \pm 0.14\%$, possibly due to the methodology used. The content of bixin, the most abundant bioactive compound in annatto, was higher in the *in natura* sample (A1) with a value of $1.14 \pm 0.03\%$. The *in natura* sample also presented superior results for almost all antioxidant analyses, except for flavonoids, in which the A4 encapsulated obtained the highest concentration, being the encapsulated sample that best stood out in the antioxidant activities. In the analysis of the antimicrobial potential, only the annatto *in natura* sample showed the ability to inhibit the growth of the *S. aureus* bacteria, with a CMI value of $417.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, not being able to inhibit the growth of the bacterium *E coli*. With the results obtained in the present work, the encapsulated that stood out was the A4, being, therefore, the most suitable for consumption, if it is not possible to consume the sample *in natura*. In addition, from the results obtained, it is evident that the composition of the product must be considered for consumer choice in order to guarantee the expected benefits of its consumption.

Keywords: centesimal composition; antioxidants; antimicrobials, bixin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases da maturação do urucum.....	16
Figura 2 - Estrutura molecular Bixina (A) e Norbixina (B).....	17
Figura 3 - Pó de urucum encapsulado.....	26
Figura 4 - Esquema de experimento de microdiluição em placa para definição da concentração mínima inibitória do extrato de urucum.....	33
Figura 5 - Teste de disco difusão utilizando os extratos de urucum para (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	40
Figura 6 - Placa de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória do extrato de sementes de urucum <i>in natura</i> contra <i>S. aureus</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura e especificação das amostras.....	26
Tabela 2 - Médias (\pm desvio padrão) dos resultados das análises físico-químicas das amostras de sementes de urucum e encapsulados (n=2).....	37
Tabela 3 - Médias (\pm desvio padrão) dos resultados das análises antioxidantes dos extratos etanoicos de sementes de urucum e encapsulados (n=3).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico)
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	butil- hidroxil- anisol
BHT	butil- hidroxitolueno
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padroes para alimentos
DMSO	Dimetilsulfoxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAG	Equivalente de ácido gálico
EQ	Equivalente de Quercitina
EQT	Equivalente Trolox
FAO	Food and Agriculture Organization
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
L	Litro
HCl	Ácido clorídrico
G	grama
MH	Mueller-Hinton
CH ₃ COONa · 6H ₂ O	Tampão acetateo de sodio
FeCl ₃	Cloreto de ferro
KOH	Hidróxido de potássio
m/v	Massa por volume
v/v	Volume por volume
O ₂	Oxigênio
OH	Hidroxila
Fe	Ferro
MAPA	Ministerio da Agropecuaria, Pecuaria e Abasteciemnto
mg	miligrama
mL	mililitro
Mmol	micromole
Mol	molares
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetros
P.A.	para analise
PG	propil galato
Rpm	rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBHQ	terc- butil- hidroquinona
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
UV-VIS	ultravioleta-visível
Cm	Centímetros
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
R\$	Reais
pH	Potencial de hidrogenio
µl	microlitros
µm	micrômetro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Características gerais do urucum	14
3.2	Aplicações do urucum como corante natural	18
3.3	Aplicações farmacológicas do urucum	20
3.3	Radicais livres e estresse oxidativo	21
3.4	Antioxidantes	23
3.5	Urucum em pó encapsulado	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Amostras	26
4.1.1	Preparo da amostra <i>in natura</i> (sementes)	26
4.2	Caracterização físico-química	27
4.2.1.	Análise de umidade	27
4.2.2	Análise de cinzas	27
4.2.3.	Determinação do teor de proteínas	27
4.2.4.	Determinação do teor de lipídeos	27
4.3	Determinação da concentração de bixina	28
4.5	Potencial antioxidante	29
4.5.1	Obtenção dos extratos etanólicos	29
4.5.2	Determinação de Flavonoides	29
4.5.3	Determinação de Compostos Fenólicos	30
4.5.4	Atividade antioxidante pelo método FRAP	30
4.5.6	Análise antioxidante pelo método de ABTS	31
4.6.	Potencial antimicrobiano dos extratos	32
4.7	Análise estatística	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Caracterização físico-química	34
5.2	Potencial antioxidante	37
5.3	Atividade antimicrobiana	40
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

8.	REFERÊNCIAS.....	44
	APENDICE A.....	53

1 INTRODUÇÃO

A demanda por um estilo de vida mais saudável, vem potencializando os estudos a procura de compostos bioativos naturais que possam ter ação antioxidante. A geração de radicais livres é um processo fisiológico e contínuo, que pode ser potencializado pelos altos níveis de estresse, má alimentação e má qualidade de sono, com isso aumentando as chances de doenças decorrentes dos seus efeitos no organismo.

As moléculas com efeito antioxidante podem ser produzidas pelo próprio organismo ou consumidas através da dieta. O urucum (*Bixa orellana* L) é uma planta de origem amazônica que produz um fruto em formato de cápsula, que se abre em duas partes iguais cobertas por espinhos flexíveis contendo as sementes. Nas sementes há uma fina camada de pigmento de coloração vermelha, composta especialmente pela bixina, sendo tradicionalmente utilizada pelos aborígenes na proteção contra raios UV e insetos por meio de pinturas na pele, efeitos medicinais, além de ser uma planta ornamental.

Atualmente, seu uso na indústria é vasto, especialmente como corante em alimentos e cosméticos, e tem sido reconhecido pelo seu potencial de produção de moléculas bioativas. Esses compostos são derivados do metabolismo secundário vegetal, e incluem moléculas do grupo de fenólicos, flavonóides e carotenóides dentre eles a bixina. Essa molécula é reconhecida pelas suas propriedades funcionais, dentre elas a atividade antioxidante, e relacionada à proteção contra o câncer, problemas cardiovasculares e envelhecimento.

Uma forma de consumir esses produtos naturais com bioatividade é por meio dos produtos encapsulados, que tem como finalidade a proteção dos compostos ativos que são utilizados em seu núcleo, aumentando assim a vida útil do nutracêutico, e sendo capaz de potencializar a sua atividade, pois é possível eleger onde a cápsula será dissolvida no organismo humano. No entanto, a composição do interior dos produtos encapsulados pode afetar o conteúdo de compostos bioativos presentes, tendo implicações nos efeitos desejados pelo seu consumo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar sementes de urucum *in natura* e produtos de urucum encapsulados, vendidos como nutracêuticos, quanto às propriedades físico-químicas, teor de bixina, potencial antioxidante, e atividade antimicrobiana, a fim de verificar diferenças nas propriedades de interesse entre os diferentes produtos.

2. OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar aspectos físico-químicos, potencial antioxidante e antimicrobiano de urucum comercializados na forma de sementes *in natura* e produtos encapsulados.

2.2. Objetivos específicos

- Definir o teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas das amostras analisadas.
- Quantificar o teor de bixina das amostras analisadas.
- Definir o potencial antioxidante das amostras.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos das diferentes amostras de forma qualitativa e quantitativa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais do urucum

O urucuzeiro é uma planta arbórea, com o nome científico de *Bixa orellana* L., pertencente à família Bixacea, à qual também pertencem as espécies *B. orellana*, *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa* e *B. urucurana*. Sua origem é possivelmente pré-colombiana, oriundas das américas central e Sul, pertencente ao bioma amazônico, com a denominação de urucu, urucum, açafroa e açafroeira da terra (LORENZI, 1998; MOREIRA et. al. 2015). O nome urucum é derivado da palavra tupi “*uru-ku*” que significa vermelho, é utilizada pelos indígenas para ornamentos de cerâmicas para uso doméstico, medicação e proteção contra insetos e raios solares.

O primeiro registro desta planta, encontra-se numa carta de Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal em 1500, na qual descrevia várias plantas brasileiras incluindo o urucum, como segue: “...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).

A árvore pode alcançar cerca de 6 metros de altura, tem folhas de dimensões de médias a grandes em coloração verde clara, suas flores hermafroditas (Figura 1A), com tonalidades de rosa, brancas ou lilases, a floração tende a ser escalonada, ou seja, abrem primeiramente as flores da parte superior da planta e depois as das partes inferiores. O urucuzeiro tem seu processo de floração e frutificação durante o ano todo, tem um melhor desenvolvimento em regiões úmidas e com chuvas regulares (COSTA, *et. al.* 2009).

Apesar das flores hermafroditas, a taxa de autofecundação é baixa. O principal agente polinizador do urucum são as abelhas, que agem em sua maioria no período da manhã, principalmente das espécies *Trigona spinipes*, *Apis mellifera*, *Schwarziana quadripunctata* e *Tetragonisca angustula* (COSTA, *et. al.* 2008). Prevalece, portanto, a polinização cruzada, perdurando a xenogamia¹, podendo ocorrer em poucos casos a geitonogamia², gerando assim uma grande variedade genética nas sementes. Esse é um dos fatores principais que afetam a produtividade e a qualidade dos grãos (SÃO JOSÉ; REBOUÇAS, 1990; VILARES *et. al.* 1992).

A primeira floração do urucuzeiro transcorre após os seis meses após o plantio, a segunda ocorre entre o 12 e 15 meses, sendo que a polinização se dá no período de 90 dias após a floração e a maturação entre 60 dias até o ponto da colheita (COSTA, *et. al.* 2009).

Os frutos de urucuzeiro são chamados de cápsulas ou cachopas, ovóide ou globosa (Figura 1B), contendo de dois a três carpelos que variam de 3-4 cm de comprimento e 3-4,5 cm de diâmetro, na qual encontram-se sementes de 5 a 6 mm de comprimento. Externamente, são revestidos por espinhos inofensivos, que apresentam cores diferentes antes da maturação, variando do verde claro ao verde escuro, amarelo claro ou vermelho escuro. Um urucum bem desenvolvido pode fornecer em média 40 a 50 sementes e pode conter até 70 cápsulas de sementes. Essas sementes podem ser utilizadas tanto para a obtenção de mudas quanto para a produção de tinturas (FRANCO *et. al.* 2008; CASTRO *et al.*, 2009).

As sementes são espessas e redondas, cobertas por uma polpa avermelhada e macia, tornando-se seco, duro e escuro quando maduro exposto (Figura 1C). Seu comprimento e diâmetro médios são 0,55 e 0,4 cm, respectivamente (FRANCO *et. al.* 2008). A Figura 1D, apresenta os frutos prontos para a colheita e processamento.

¹ Polinização de uma flor pelo pólen de uma flor geneticamente diferente da mesma espécie

² Polinização por flores de uma mesma planta

Figura 1 - Fases da maturação do urucum.



A- Flor do urucum com estigmas a mostra; B- Cápsula de urucum fechada; C- Cápsula de urucum aberta apresentando as sementes; D- Cápsula de urucum madura pronta para a colheita

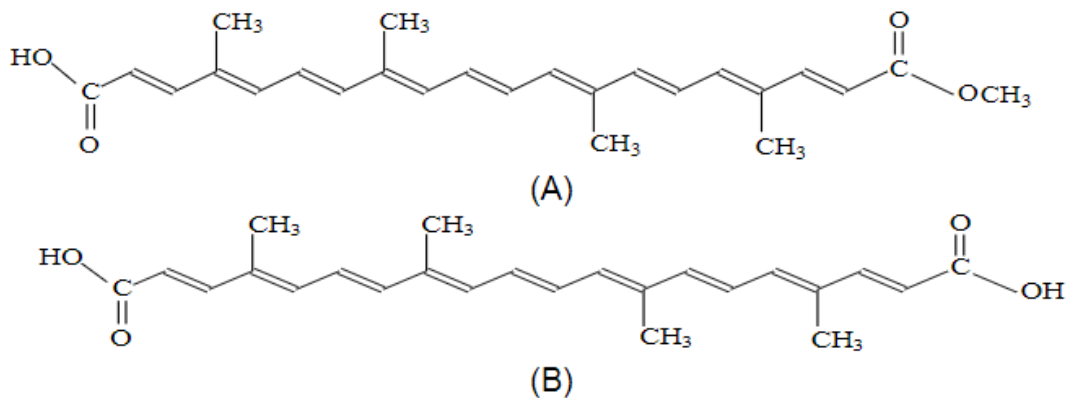
Fonte: FRANCO *et. al.* 2008

As sementes são revestidas pelo pericarpo, onde se encontra o corante que no Brasil é conhecido popularmente como colorau, usado na alimentação para dar cor e sabor aos alimentos. Um dos corantes principais do urucum é a bixina ($\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{O}_6$, Figura 2A), um diapo-carotenóide, composto pela parte central da molécula de carotenóide, sem o anel terminal característico possuindo uma cadeia de isopreno de 25 carbonos e um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades (CASTRO *et. al.* 2009; OLIVEIRAS *et. al.* 2015; FREIRE, 2017).

A bixina é o pigmento com maior teor nas sementes, correspondendo por mais de 80% dos carotenóides totais. É lipossolúvel e pode ser extraída com alguns solventes orgânicos. Essa extração é limitada pelo uso de solventes compatíveis com o uso do produto final (FRANCO *et. al.* 2008).

Através do processo de saponificação, a bixina pode produzir outros corantes, como Norbis, sal de Norbis e produtos de degradação quente (OLIVEIRAS *et. al.* 2021) de coloração avermelhada, que age como fixador da cor nos produtos comerciais, utilizado pelas indústrias de bebidas, massas, laticínios, embutidos, cosméticos e tintas (CASTRO *et. al.* 2009). Ainda na semente, é encontrado outro corante em menores concentrações, chamado de norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$, Figura 2), conhecida também como orelhina. Essa molécula resulta da hidrólise do grupo metila do éster da bixina, possui coloração amarelada e é solúvel em água (FREIRE, 2017), sendo utilizada em iogurtes, sorvetes, cervejas e queijos. Por ser um carotenóide, é um dos corantes naturais com maior estabilidade (CASTRO *et. al.*, 2009; OLIVEIRAS *et. al.* 2021).

Figura 2 - Estrutura molecular Bixina (A) e Norbixina (B)



Fonte: SILVA, BIZERRA & FERNANDES (2018)

No mercado de corantes naturais, o urucum é responsável por 90% do total de corantes do país, e aproximadamente 70% do mundo. No Brasil, os estados do Sudoeste são responsáveis pela maior parte dessa produção (IBGE, 2019), com a produção de aproximadamente 6.452 toneladas de semente de urucum, seguidos pela região Norte com a produção de 4.718 toneladas, Nordeste com 2.379 toneladas, Centro-oeste com 1.331 toneladas e finalmente com a região Sul com 745 toneladas (IBGE, 2019). Esse mercado é favorecido pela proibição do uso de corantes sintéticos nos alimentos. A Itália já proibiu o uso desses corantes e a União Europeia e os Estados Unidos diminuíram a lista de corantes liberados, fazendo com que a exportação do urucum cresça. No entanto, como a disseminação da planta é realizada

majoritariamente por sementes, não há a garantia de que a produção da bixina esteja dentro das normas de 2,5 % (POLTRONIERI, BOTELHO FABRI, 2015).

No ano de 1991 foi realizado o primeiro estudo sobre a viabilidade econômica da produção de urucum (ROCHA *et al.*, 1991). De acordo com os autores, a colheita do urucum ocorre principalmente três anos após o plantio, mas no segundo ano já se consegue lucro, tendo em vista que não há homogeneidade nas mudas plantadas devido à propagação por sementes (ROCHA *et al.*, 1991). Atualmente o comércio é majoritariamente para empresas de beneficiamento dos frutos. Em 2016, foram pagos R\$ 3,46 por porcentagem de bixina ou R\$ 19,73 reais por quilo da semente (GIULIANI, 2017).

O processo pós colheita é extremamente importante para a qualidade do produto, começando imediatamente após o término da colheita, passando pelas etapas de recolhimento, descachopamento, peneiramento, secagem, ensacamento, armazenamento, classificação, beneficiamento e comercialização. O tempo total desse processo deve acontecer em até 60 dias, após isso é necessário que haja o armazenamento em câmara fria a 10°C (SANTANA *et al.*, 2008).

A bixina é altamente suscetível à degradação e a oxidação, sensível à mudança na luz, temperatura, pH, portanto, as condições de armazenamento são importantes para garantir a sua biodisponibilidade. A cor, a absorção da luz e as propriedades antioxidantes da bixina são o resultado de ligações duplas conjugadas na sua estrutura química, o que também é a causa da sua instabilidade química (KAPOOR, RAMAMOORTHY; 2021). Para melhorar a estabilidade e biodisponibilidade da bixina, processos como microencapsulação e nanoemulsão (encapsulação de materiais bioativos de milímetros a nanômetros em cápsulas seladas) podem ser usados (GREEN 1955 apud KAPOOR, RAMAMOORTHY; 2021).

3.2 Aplicações do urucum como corante natural

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 intensas. A aplicabilidade das sementes de urucum concentra-se na indústria de alimentos (SANDI, CUEN e BACERRA, 2003). Neste setor, a demanda por corantes naturais vem crescendo, com destaque para o urucum devido a sua

menor toxicidade e melhor biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente, quando comparado aos corantes sintéticos (SHAHID-UL-ISLAM *et al.*, 2014). O corante de urucum é um dos poucos naturais permitidos pela Food and Agriculture Organization (FAO) para aplicação em alimentos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998).

Em geral, o uso dos corantes tem como objetivo tornar os produtos mais atrativos ao público consumidor. O consumo dos corantes naturais, além de colorir o produto final (NAZARÉ *et al.*, 1996) pode trazer benefícios adicionais por possuir 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, utilização mais frequente é na indústria de salsicharia. Há ainda usos nas indústrias de sorvetes, confeitaria e massas (LIMA *et al.*, 2005). Outras indústrias que também utilizam são as indústrias de maquiagem e cosméticos e as indústrias têxteis (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Outro importante mercado dos pigmentos do urucum é a indústria de condimentos para fabricação de coloríficos, temperos e outros produtos usados na gastronomia brasileira. De acordo com Tocchini e Mercadante (2001) o colorífico 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.

A mistura de corantes de urucum com outros corantes naturais aumenta suas aplicações em alimentos, pela possibilidade de produzir diversas tonalidades de cores. A coloração vermelha pode ser obtida quando o urucum é misturado com carmim, beterraba ou antocianinas. A coloração escura é obtida quando o urucum e a clorofila são misturados (RODRIGUES *et al.*, 2018). Misturas como urucum/ carmim, urucum/ curcumina e urucum/ caramelo são comuns na indústria alimentícia. Os pigmentos de urucum também podem ser utilizados em medicamentos (líquidos e sólidos) (ALBUQUERQUE E MEIRELES, 2011; GALINDO-CUSPINERA *et al.*, 2003).

Além da vasta utilização como corante na indústria alimentícia, o pigmento de urucum, em suas diversas formas, pode ser utilizado como antioxidante, atuando na prevenção da peroxidação lipídica em alimentos, autooxidação e ação contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GIRIDHAR *et al.*, 2014). Eles também têm atividade antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2018). Na alimentação animal tem sido utilizado na composição de rações para aves e para melhorar a coloração da gema de ovo (RODRIGUES *et al.*, 2018).

3.3 Aplicações farmacológicas do urucum

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 e composição química. Desta forma, a cultura popular contribuiu para a divulgação da ação terapêutica de determinadas plantas. Assim, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém ativa a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL, PINTO e VEIGA JÚNIOR, 2002).

Para o urucum há várias propriedades medicinais que têm sido atribuídas às diferentes partes da planta (KHARE, 2007), entre elas propriedades adstringentes, antieméticas e auxílio na redução de colesterol. Os brotos são usados como uma bebida semelhante ao chá, com propriedades afrodisíacas e adstringente, e também em casos de febre, disenteria e hepatite. As folhas têm um efeito marcante no sistema urinário e aumentam o volume de urina em casos de insuficiência renal ou cistite; sendo também utilizadas em infusões no tratamento de diabetes, icterícia e desinteria, e utilizados externamente para problemas de pele e para evitar cicatrizes (RAVINDRAN, DIVAKARAN e PILLAI, 2012). Infusões da raiz e da casca são usadas para reduzir a febre. Ainda, a polpa da semente possui propriedades hemostáticas, antidisentéricas, diuréticas e laxativas (KHARE, 2007).

Os usos do urucum variam ao redor do mundo. Os curandeiros tradicionais na Colômbia também usam o urucum como soro antiofídico em casos de picada de cobra. No Peru, as folhas secas são chamadas de achiotec e são consumidas após decocção por apresentar efeitos benéficos relatados em muitos distúrbios diferentes (por exemplo, problemas de próstata, hipertensão arterial, obesidade). A decocção também é usada externamente como anti-séptico cicatrizante (RAVINDRAN, DIVAKARAN e PILLAI, 2012). No Gabão, uma decocção de folhas é usada para interromper o vômito, enquanto nas ilhas Seychelles e Maurícias o urucum é adicionado aos banhos para reduzir a dor muscular. Na Etiópia, as folhas são aplicadas como curativo (KHARE, 2007).

Muitas pesquisas têm sido realizadas para melhorar a compreensão dos efeitos benéficos do urucum e dos compostos que são responsáveis por esses efeitos. Foi

descoberto que um extrato de água da raiz possui atividade hipotensora em ratos (este efeito hipotensor tem sido reconhecido em ervas regionais do Peru). O extrato também apresentou propriedades relaxantes musculares e reduzia as secreções gástricas (DUNHAM *et al* 1960). Terashima *et al* (1991) investigaram os possíveis benefícios do urucum para pacientes com diabetes. As folhas de urucum demonstraram inibir a ação da aldose redutase, que se acredita desempenhar um papel na neuropatia diabética. O extrato de semente de urucum mostrou reduzir os níveis de glicose no sangue em casos de cães diabéticos induzidos por estreptozotocina. Em um outro estudo, foi demonstrado que a redução do nível de glicose no sangue é devido à estimulação da utilização periférica da glicose (RUSSELL *et al.*, 2008).

Otero *et al.* (2000) confirmaram, em camundongos, a eficácia de uma preparação de folha/casca usada na Colômbia para neutralizar picadas de cobra. As propriedades antibacterianas do urucum foram demonstradas *in vitro* por Cáceres *et al.* (1995), onde várias populações bacterianas, incluindo *Escherichia coli* e *Staphylococcus*, foram adversamente afetadas por extratos de flores e folhas de urucum; os resultados apoiam seu uso como tratamento de infecções em sistemas de medicina tradicional. Os constituintes do urucum que demonstraram ter propriedades benéficas em laboratórios, incluem o composto antibacteriano ácido maslínico, que foi isolado das folhas.

Esses benefícios também estão ligados à sua capacidade antioxidante, onde atuam no metabolismo humano combatendo os radicais livres, inibindo o estresse oxidativo das células, favorecendo assim a saúde e bem-estar. Na natureza de longo prazo deste processo tem um impacto relevante no processo etiológico de muitas doenças crônicas não transmissíveis, incluindo aterosclerose, diabetes, obesidade, doenças neurodegenerativas e câncer, e em um estudo retrospectivo, pode desencadear eventos patológicos que em por sua vez estão envolvidos em processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (HALLIWEL, WHITERMAN, 2004; GREEN *et. al.*, 2004; FERRARI, 2004).

3.3 Radicais livres e estresse oxidativo

A geração de radicais livres é um processo fisiológico contínuo com funções biológicas relacionadas. Durante o metabolismo, esses radicais livres atuam como

mediadores da transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Sua produção em proporções adequadas através da cadeia de transporte de elétrons possibilita a produção de ATP (energia), a ativação da fertilização do óvulo, genes e envolvimento de mecanismos de defesa durante a infecção. No entanto, a superprodução pode levar a danos oxidativos (NJIE, EAM; 2004).

A produção contínua de radicais livres durante o metabolismo acaba levando ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes. Estes visam limitar os níveis intracelulares de tais substâncias ativas e controlar a ocorrência dos danos resultantes (ALA, 1997).

A instalação do processo de estresse oxidativo se deve à presença de um desequilíbrio entre oxidantes e compostos antioxidantes que favorecem a superprodução de radicais livres ou a custa da velocidade de removê-los. Esse processo resulta na oxidação de biomoléculas, perdendo assim sua função biológica e/ou homeostase, manifestando-se como potencial dano oxidativo às células e tecidos (NJIE, EAM; 2004).

O mecanismo de produção de radicais livres geralmente ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma. Este mecanismo pode ser particularmente favorecido por íons de ferro e cobre. As mitocôndrias são a principal fonte de radicais livres através da cadeia de transporte de elétrons (BARBOSA *et. al.*, 2010).

Em condições fisiológicas, o exercício aeróbico metaboliza 85% a 90% do oxigênio (O_2) é consumido nas mitocôndrias através da cadeia de transporte de elétrons, os 10% restantes a 15% usado por várias enzimas Oxidases e oxigenases e reações químicas para oxidação direta. Na mitocôndria, O_2 sofre uma redução tetravalente, aceitando quatro elétrons, formando água. A enzima que catalisa essa reação é a citocromo oxidase. A ação da citocromo oxidase controla a produção de radicais livres, evitando sua superprodução nas mitocôndrias. No entanto, cerca de 2% a 5% do metabolismo do oxigênio nas mitocôndrias é desviado para outra via metabólica é reduzido monovalentemente, resultando em radicais livres (SCHNEIDER, OLIVEIRA; 2004).

Além da capacidade do O_2 de participar de reações geradoras de $OH\bullet$, ele também pode gerar espécies reativas de nitrogênio, peroxinitrito, ao reagir com o radical óxido nítrico, que também é potencialmente ativo (SCHNEIDER, OLIVEIRA; 2004).

Os ácidos graxos poli- insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres, alcoxila e peroxila, por meio da lipoperoxidação. Tal processo constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GREEN *et. al.*, 2004).

O radical OH •, por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal processo (BARBOSA *et. al.*, 2010).

Entretanto, a participação do ferro também é considerada fator determinante, ressaltando-se a importância da relação equimolar entre Fe³/ Fe², para possibilitar a iniciação deste processo. Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais que, por serem potencialmente reativos iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas dependendo da camada de valência do ferro (ALA, 1997).

3.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são um conjunto de substâncias heterogêneas formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais que bloqueiam o efeito maléfico dos radicais livres. O termo antioxidantes é definido como o que impede a oxidação de outras substâncias químicas, que podem acontecer nas reações metabólicas ou por fatores exógenos. Sendo eles encontrados em alimentos em sua maioria nas frutas e vegetais (RAMALHO; JORGE., 2006).

A utilização de compostos antioxidantes na indústria alimentícia tem sido estudada em função do retardamento das reações oxidativas. O conhecimento das propriedades de vários produtos químicos para prevenir a oxidação de gorduras e alimentos gordurosos começou com estudos clássicos de Moureu e Dufraise. Durante a primeira Guerra Mundial e pouco depois, estes pesquisadores testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta pesquisa básica, combinada com a vasta importância da oxidação em praticamente todas as operações de manufatura, desencadeou uma busca por aditivos químicos para controlar a oxidação, que ainda hoje está em curso. Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano (BALEY, 1996).

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações; ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e oxidantes mistos. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. (SIMIC; JAVANOVIC; 1994; FRANKEL, 1980).

Os antioxidantes principais e mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil- hidroxil- anisol (BHA), butil- hidroxitolueno (BHT), terc- butil- hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais. Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (BALEY, 1996; NAMIKI, 1990).

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que quando utilizado em conjunto com os antioxidantes primários aumentam a sua ação. Alguns antioxidantes primários quando usados em combinação podem atuar sinergicamente (BALEY, 1996) um exemplo disso é o ácido ascórbico.

Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da oxidação. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são os melhores exemplos deste grupo (BELITZ; GROSCH.;1998).

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como a glicose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício (KEHRER.; SMITH., 1992).

Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Atuando em um par de elétrons não compartilhados na sua estrutura molecular promovem a ação de

complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (BALEY, 1996).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (BALEY, 1996).

3.5 Urucum em pó encapsulado

O encapsulamento 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).

Os principais 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, perda de cor ou valor nutricional, separação de componentes reativos ou incompatíveis, taxa reduzida de migração de material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, muito rapidamente no caso de compostos de sabor não encapsulados), evitar reação prematura de substratos, mascarar compostos de odor, promove melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas de secagem. 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; MOREIRA, 2013).

Nutrientes como vitaminas, ácidos graxos, poliinsaturados, minerais, antioxidantes, etc. podem ser encapsulados para prolongar a vida útil do produto e reduzir a suscetibilidade a danos e degradação oxidativa, aumentando assim seu valor agregado (CLARK, 2002). O encapsulado de pó de urucum é comercializado em forma de vitamina A, que está presente em grande quantidade em sua composição. Há poucos registros na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, para esse suplemento à base de urucum na categoria de suplemento vitamínico, mineral ou nutracêutico (MOREIRA, 2013). É utilizado como nutracêutico devido a sua capacidade de promover uma boa digestão, fortalecer ossos, diminuir febres, ajudar na saúde dos olhos, eliminar dores de cabeça, reduzir náuseas, retardar o envelhecimento e efeito cicatrizante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises propostas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Toledo.

4.1 Amostras

As sementes de urucum *in natura* foram obtidas com um produtor rural da região e os produtos encapsulados de urucum foram adquiridas no comércio local de Toledo (Tabela 1, Figura 3), as amostras foram separadas em quatro grupos, sendo um o *in natura* e tres encapsulado.

Tabela 01 - Nomenclatura e especificação das amostras.

Nomenclatura da amostra	Especificação dos componentes
A1	Sementes <i>in natura</i>
A2	Sementes em pó, amidos, acetato de retinol, antiemectante metassilicato e ácido de magnésio.
A3	Sementes em pó
A4	Sementes em pó

fonte: da autora, 2022

Figura 3 - Pó de urucum encapsulado



Fonte: da autora, 2022

4.1.1 Preparo da amostra *in natura* (sementes)

Os grãos de urucum foram secos em estufa de circulação fechada, por 72 horas a 55°C Solab com erro de mais ou menos dois graus. Posteriormente foram

trituras utilizando um moinho de facas SL-30 da Solab, classificados em peneiras com tamanho da partícula igual a 200 μm , para que atingisse granulometria próxima a do urucum em pó encapsulado.

4.2 Caracterização físico-química

4.2.1. Análise de umidade

A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa Solab. Inicialmente, realizou-se a pesagem de aproximadamente 5 gramas de amostra, a qual foi levada à estufa a uma temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, e pesada novamente (IAL, 1985). A avaliação foi realizada em duplicata.

4.2.2 Análise de cinzas

As cinzas foram determinadas com a pesagem de 5 gramas da amostra em um cadinho de porcelana previamente aquecido em mufla (Quimis) a 550°C , resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Após, submeteu-se à incineração em mufla a 550°C por 4 horas até obtenção do resíduo de coloração cinza esbranquiçada (IAL, 1985). A avaliação foi realizada em duplicata.

4.2.3. Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Bradford, o qual consiste em adicionar 50 μL de amostra, o mesmo volume de NaOH 1N (40,0 g de hidróxido de sódio P.A. (Dinâmica), para um balão volumétrico de 1000 mL) e 5,0 mL de solução Coomassie Blue (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, dissolvido em 50 mL álcool etílico 95%, 100 mL de ácido ortofosfórico 85% e completado a solução para 1000 mL com água destilada, deixado em repouso por 4 horas e filtrado por gravidade), esperou-se 5 minutos e posteriormente realizou-se a leitura de espectrofotômetro UV-vis (T80+ PG instruments) a 595 nm. A avaliação foi realizada em triplicata.

Para a curva de calibração foi utilizado o padrão de Albumina comercial ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e realizado o mesmo procedimento anteriormente citado para soluções contendo de 0 a $0,70\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (GUIMA et al. 2013).

4.2.4. Determinação do teor de lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada pelo método de Bligh Dryer, iniciada com a correção da umidade da amostra para 80%. Em 3 gramas de amostra corrigida para umidade necessária foram adicionados 15 mL de clorofórmio P.A. (Synth) e 30 mL de álcool metílico (Êxodo científico), homogeneizado em mesa agitadora (ALS-AMD) por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 15 mL de água destilada e levado novamente a mesa de agitação por mais 5 minutos. As amostras foram então filtradas a vácuo com a adição de 15 mL clorofórmio para o auxílio da transferência total da amostra do béquer para o filtro, colocado em funil de separação por 24 horas. A avaliação foi realizada em duplicata.

Posteriormente, a fase orgânica foi retirada e levada para o rotaevaporador (Solab), com a retirada completa do solvente, conseguiu-se por meio da diferença de peso determinar a quantidade de lipídeos presente na amostra (BENTO *et al.* 2017).

4.3 Determinação da concentração de bixina

A extração da bixina foi realizada com hidróxido de potássio (KOH) 5% utilizando 2,5 gramas da amostra. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 15 mL da solução de KOH a 5% e colocou-se para ferver em chapa de aquecimento (ALS-AMD). Ao entrar em ebulição, adicionou-se a amostra, mantendo-as em aquecimento por 1 minuto. Sem agitar, esfriou-se em água corrente. Em um balão volumétrico de 100 mL, filtrou-se a solução e, posteriormente, realizou-se uma lavagem com água destilada de sete a nove vezes, e completou o balão até 100 mL.

Finalmente, tomou-se uma alíquota de 2 mL da solução corante filtrada, e colocou-se em outro balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a solução de KOH a 0,5%, fornecendo o extrato alcalino.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (T80+ PG instruments) com comprimento de onda de 453 nm, utilizando como branco solução de KOH a 0,5%. As leituras foram realizadas em triplicata e a média foi aplicada na equação 01 para calcular o teor de bixina:

$$Bi(\%) = \frac{Abs.fD.Vm}{E.m} \times 1,037 \quad (01)$$

Onde os parâmetros são: Abs é a absorbância obtida, fD o valor de diluição usado (1000 mL), V= volume inicial do extrato, E= coeficiente específico de extinção

usado 3473 mol cm^{-1} e m a massa da amostra usado 25 gramas, o valor de 1,037 é o fator de conversão (Yabiku e Takahashi 1991).

4.5 Potencial antioxidante

4.5.1 Obtenção dos extratos etanólicos

Os extratos foram preparados com a adição de 1 grama de amostra e 5 ml de etanol P.A. LSChemicals e levado ao banho ultrassônico por 25 minutos, repetindo essa operação por três vezes, totalizando 15 mL de solvente. As amostras foram posteriormente centrifugadas (Parsec) por 4000 rpm por 30 minutos e transferidas para frascos âmbar e armazenadas em freezer convencional.

4.5.2 Determinação de Flavonoides

A quantificação de flavonóides presente nos extratos de urucum foi determinada através da reação do extrato com cloreto de alumínio, conforme descrito em (WOISKY, SALATINO. 1998) com modificações. Inicialmente, realizou-se a diluição dos extratos em seus respectivos solventes extratores de modo a formar uma proporção 1:10 (volume de extrato: volume de solvente extrator). Em seguida, transferiu-se 500 μL dessa solução para um tubo falcon de 15 mL embrulhado em papel alumínio, ao qual adicionou-se 250 μL de uma solução de cloreto de alumínio 5,0 % (m/v) preparada em metanol e 4,25 mL de metanol. Esta mistura permaneceu em repouso em temperatura ambiente durante um período de 30 minutos e em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis a um comprimento de onda de 425 nm, utilizando-se cubeta de quartzo. A mistura lida como branco foi preparada da mesma forma, utilizando-se metanol no lugar do extrato.

Os resultados foram expressos em termos de equivalente de quercetina (mg quercetina g^{-1}), o qual foi obtido a partir da curva de calibração. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas soluções com concentração de 10, 20, 30, 40 e 80 mg de quercetina L^{-1} , em metanol, preparadas a partir de uma solução estoque de quercetina com concentração de 160 mg L^{-1} . Após o preparo das soluções foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, utilizando as soluções de quercetina no lugar das soluções de extrato. A quantificação do teor de flavonoides foi realizada em triplicata.

4.5.3 Determinação de Compostos Fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de urucum foi determinada através do método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, conforme descrito em SINGLETON & ROSSI (1965) com modificações. Inicialmente, realizou-se a diluição dos extratos em seus respectivos solventes extratores de modo a formar uma proporção 1:10 (volume de extrato: volume de solvente extrator). Uma alíquota de 250 μL deste extrato diluído foi retirada e transferida para um tubo falcon de 15 mL embrulhado em papel alumínio, utilizando-se uma micropipeta. Em seguida, adicionou-se 250 μL de uma solução de Reagente *Folin Ciocalteu*: água destilada 1:1 (v/v), 500 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (35 g de Na_2CO_3 em 100 mL de água destilada, preparado sob agitação magnética), 4,0 mL de água destilada. A mistura foi mantida a 28 °C por 25 minutos, sendo então centrifugada a 3000 rpm (centrífuga Parsec) durante 10 minutos. As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis, com cubeta de quartzo, a um comprimento de onda de 725 nm. Um branco foi preparado da mesma forma que as amostras, com volume de extrato sendo substituído por metanol.

Os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG), o qual foi obtido a partir da curva de calibração. Para a construção da curva de calibração, realizou-se diferentes diluições a partir de uma solução estoque de ácido gálico com concentração de 200 mg L^{-1} (0,010 g de AG em 50 mL de água destilada). Deste modo, realizou-se as diluições para o preparo de soluções com concentrações de: 150 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} , 50 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} e 0 mg L^{-1} , completando o volume com água destilada e sob proteção da luz. Após o preparo dos padrões, retirou-se 250 μL de cada solução e transferiu-se para tubo falcon de 15 mL embrulhados em papel alumínio, os quais foram submetidos às mesmas condições descritas anteriormente para esta análise e realizados em triplicata. A quantificação do teor de compostos fenólicos foi realizada em triplicata.

4.5.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP

O poder de redução dos extratos foi determinado utilizando-se o método FRAP (do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*), conforme descrito por BENZIE & STRAINS (1996) com modificações. Inicialmente, preparou-se as soluções: TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina) a 10 mmol L^{-1} (0,16 g de TPTZ em um balão de 50 mL, adicionando-se inicialmente uma solução de HCl 1,0 mol L^{-1} para dissolução da

substância e em seguida volume completado com água destilada.), tampão acetato de sódio 300 mmol L⁻¹ (3,1 g de CH₃COONa·6H₂O dissolvidos em 16,0 mL de CH₃COOH concentrado, e completado o volume para 1,0 L utilizando-se água destilada.), com pH igual a 3,6 e uma solução de FeCl₃ a 20 mmol L⁻¹ (0,16 g de FeCl₃ dissolvida em água destilada em balão de 50 mL. Em seguida, utilizando-se essas soluções preparou-se a solução de reagente FRAP (solução de ([Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺), seguindo a proporção 10:1:1 (v/v/v) de solução tampão:TPTZ:FeCl₃·6H₂O. A solução de reagente FRAP foi preparada sob proteção da luz utilizando-se papel alumínio, a uma temperatura constante de 37 °C em banho termostático (Centouro). Posteriormente, adicionou-se 100 µL de solução de extrato (volume de extrato: volume de solvente extrator) a um tubo falcon de 15 mL embrulhado em papel alumínio, ao qual adicionou-se em seguida 3,0 mL de solução de reagente FRAP e 300 µL de água destilada. Em seguida, incubou-se o tubo falcon contendo a mistura à uma temperatura de 37 °C utilizando-se banho termostático durante um período de 40 minutos. Por fim, realizou-se a medida da absorbância das soluções em espectrofotômetro UV-vis a um comprimento de onda de 593 nm, utilizando-se 3,0 mL da solução de reagente FRAP como o branco.

Os resultados foram expressos em termos de equivalente de trolox (µmol de Trolox), sendo determinados a partir da curva analítica preparada com soluções de referência cujas concentrações foram 150, 200, 250, 300, 400 e 500 µmol L⁻¹. As referidas soluções foram obtidas a partir da diluição de solução estoque de trolox de concentração 600 µmol L⁻¹). Após o preparo dos padrões, retirou-se 100 µL de cada solução e transferiu-se para tubos falcon de 15 mL embrulhados em papel alumínio, aos quais foram acrescentados 3,0 mL de reagente FRAP e 300 µL de água destilada. A solução foi submetida às mesmas condições descritas anteriormente e em seguida realizou-se a medida de absorbância. A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata.

4.5.6 Análise antioxidante pelo método de ABTS

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi analisada pelo método envolvendo o reagente ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS), realizada segundo metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com modificações, utilizando o comprimento de onda de 734

nm. Inicialmente foi preparada a solução aquosa estoque de ABTS $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (dissolveu-se 192 mg de sal ABTS em água destilada, em um balão volumétrico de 50 mL) e a solução de persulfato de potássio 140 mmol L^{-1} (dissolveu-se 378,4 mg de sal em água destilada), ambas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar e em geladeira. O preparo do cátion radicalar ABTS*+ (5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μL de solução de persulfato de potássio) deixada em repouso por 16 horas em temperatura ambiente antes do uso. Após esse tempo, 1 ml dessa mesma solução foi diluída em etanol grau HPLC (MERCK), até que a absorbância do reagente chegue em $0,700 \pm 0,050$. Em seguida adicionou-se 100 μL de extrato em um falcon protegido da luz e 3 ml da solução radicalar de ABTS. Por fim, agitou-se o falcon em agitador de soluções durante alguns segundos, deixando em repouso por 6 minutos, e medida a absorbância em espectrofotômetro UV-vis a um comprimento de onda de 734 nm, utilizando etanol como branco.

Os resultados foram expressos em termos de equivalente de trolox (μmol de trolox), obtida a partir da medida da absorbância de soluções de trolox em etanol com diferentes concentrações (0, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$), preparadas a partir da diluição de solução estoque de trolox com concentração de 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após o preparo dos padrões, retirou-se 100 μL de cada solução e transferiu-se para tubos falcon de 15 mL embrulhados em papel alumínio, aos quais foram acrescidos 3,0 mL da solução radicalar de ABTS. A solução foi submetida às mesmas condições descritas anteriormente e em seguida realizou-se a medida de absorbância. A avaliação foi realizada em triplicata.

4.6. Potencial antimicrobiano dos extratos

Para estas análises, houve uma mudança no preparo das amostras citadas no item 4.5.1, trocando o reagente Álcool Etilico P.A. por dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), e realizadas as análises a seguir.

O método de disco-difusão foi realizado com base no protocolo do CLSI M2-A12 Vol. 35, No 1, com algumas modificações para produtos naturais. As bactérias patogênicas *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foram cultivadas em caldo Müeller-Hinton (MH) durante 24 horas a 35 °C e ajustadas segundo escala de 0,5 de McFarland. A semeadura foi realizada em placas de Petri contendo o ágar MH. Em seguida, discos de celulose de 6 mm de diâmetro foram colocados e impregnados com 10 μL do extrato. As placas foram fechadas com

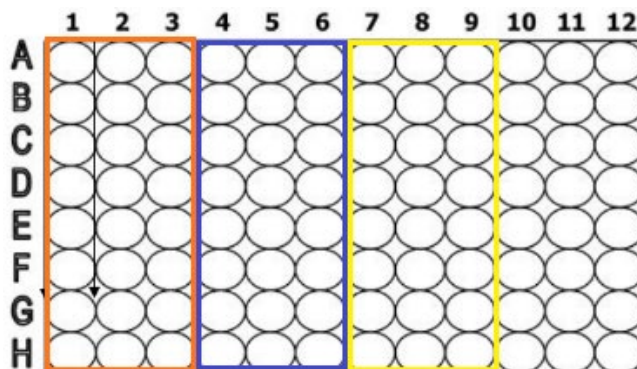
plástico filme e incubadas à 35 °C por 24 horas em câmara do tipo B.O.D. Após um período de incubação de 24 horas em temperatura a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, foi avaliada a presença de halos de inibição.

Para os extratos que apresentaram resultados positivos no método de disco-difusão, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) utilizando placas de 96 poços, utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Foram preparadas suspensões da bactéria em meio Müller Hinton (MH) com 24 horas de incubação a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a concentração ajustada para $1,5 \cdot 10^8$ células/mL (correspondente a Escala 0,5 de McFarland). Inicialmente, os poços das microplacas foram preenchidos com 100 μL do meio MH. No primeiro poço das colunas 1, 2 e 3 foi então adicionado 100 μL do extrato. Após a homogeneização, uma alíquota de 100 μL da primeira linha foi transferida para a segunda linha, obtendo-se assim as diluições seriadas de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 (VEIGA, 2016). Em seguida, foram adicionados 10 μL da suspensão bacteriana com concentração padronizada em cada poço das microplacas.

Como controles negativos foram utilizados poços contendo somente o meio de culturas (simbolizado na figura como o retângulo amarelo) e o dispersante do extrato (DMSO) (retângulo azul) sem inoculação das suspensões microbianas como apresentado na figura 4.

As microplacas foram incubadas em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi observada com a adição do corante Cloreto de Trifenil Tetrazólio, 0,5%(m/v), como reagente para confirmação dos resultados (VEIGA, 2016)

Figura 4 - Esquema de experimento de microdiluição em placa para definição da concentração mínima inibitória do extrato de urucum.



No primeiro retângulo de coloração laranja foi adicionado a amostra, no de coloração azul o solvente (DMSO) e no de coloração amarela somente o meio de cultivo.

Fonte: ANTUNES, E.A., 2017 com modificações.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com significância de 5%, e teste de Tukey ($p = 0,05$) para comparação de médias utilizando o software R.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

A etapa inicial de caracterização físico-química envolveu as análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos de amostras de urucum comercializadas na forma de cápsulas ou sementes não processadas (Tabela 2). De modo geral as amostras analisadas apresentam aspecto de pó fino (cápsulas), com odor característico e de coloração alaranjada variável.

Tabela 02 - Médias (\pm desvio padrão) dos resultados das análises físico-químicas das amostras de sementes de urucum e encapsulados ($n=2$).

Amostras	Análises físico químicas				
	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Teor de bixina (%)
A1	7,82 \pm 0,00 c	5,57 \pm 0,03 c	0,78 \pm 0,00 b	2,01 \pm 0,04 b	1,14 \pm 0,03 a
A2	8,96 \pm 0,35 b	22,39 \pm 0,09 a	0,55 \pm 0,03 c	1,94 \pm 0,01 b	0,04 \pm 0,00 d
A3	11,96 \pm 0,25 a	6,25 \pm 0,03 b	1,31 \pm 0,03 a	2,12 \pm 0,01 b	0,38 \pm 0,01 b
A4	11,89 \pm 0,09 a	2,37 \pm 0,06 d	0,85 \pm 0,01 b	2,47 \pm 0,14 a	0,30 \pm 0,00 c

Médias seguidas com letras iguais na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: da autora, 2022.

Em relação à umidade (Tabela 2), a amostra A1 teve o menor valor entre elas, provavelmente relacionado ao fato de ser a amostra *in natura* e ter passado pelo processo de secagem para o descachopamento. Esses valores são os esperados, conforme descrito por Neta (2012), onde a média das amostras de sementes urucum comercializadas no Piauí, *in natura*, variaram de 7,31% a 13,32%. Essa variação na

umidade também pode estar relacionada à variação do clima, período de colheita e o tempo de armazenamento, pois com o passar do tempo as sementes perdem água por evaporação. Ainda, em uma pesquisa realizada com 19 amostras de sementes urucum do Instituto Agrônomo de Pindorama em São Paulo, os autores apresentaram valores de umidade que variam de 2,86 a 8,56% (OLIVEIRA *et al.*, 2012), mostrando assim que os valores encontrados por esse trabalho estão dentro dos parâmetros encontrados em várias regiões do país.

A umidade também tem impacto na durabilidade do produto, sendo que um percentual elevado de umidade nas sementes poderá acarretar no aparecimento de fungos e conseqüentemente sua deterioração. Desta forma, a etapa de colheita e seleção das sementes mais secas e maduras é fundamental para a qualidade do produto (Franco *et al.*, 2008).

A amostra A2 com $8,96 \pm 0,35\%$ de umidade está dentro dos parâmetros de conservação de utilização de materiais industrializados, cujo valor máximo é de 12% (Ferreira, 2011). Já as amostras A3 e A4 apresentaram umidades estatisticamente iguais, porém superiores às apresentadas na literatura para encapsulados. No trabalho de Ferreira (2011) os encapsulados comercializados em livre comércio em diferentes partes do país, apresentam valores de umidade de $10,60 \pm 0,91\%$ em média.

Apesar das diferenças estatísticas, segundo a resolução CNNPA (Comissão Nacional De Normas E Padrões Para Alimentos) número 12, de 1978, pode-se notar que todas as amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação referente ao teor máximo de umidade que é no máximo 12% (BRASIL, 1978). Sendo assim, consideradas com boa estabilidade e bom tempo de prateleira, pois quanto mais próximo ao máximo convencionado de valores de umidade aumenta-se a chance de contaminação do produto.

Em relação ao teor de cinzas (Tabela 2) observou-se valores estatisticamente diferentes para as quatro amostras analisadas. Dentre elas a amostra A2 apresentou o maior valor ($22,39 \pm 0,09\%$), indicando um maior teor de compostos inorgânicos no produto, o que é esperado devido à composição apresentada no rótulo do produto. De acordo com o fabricante os ingredientes do encapsulado incluem além das sementes em pó, amidos, acetato de retinol, antiemectante metassilicato e ácido de magnésio.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura para teores de cinzas de amostras *in natura*, Lemos (2008) quantificou 2,99%, Franco (2008) encontrou 4,6%

e Pereira et al. (2009), encontraram 6,62%, sendo assim, os valores obtidos no presente estudo estão próximos do que foram encontrados na literatura.

Já as amostras encapsuladas A3 e A4 estão similares aos valores apresentados por Moreira 2013, o qual verificou valores de percentual de cinzas oscilando de $2,19 \pm 0,94\%$ a $7,01 \pm 3,12\%$ para encapsulados, apresentando diferença significativa entre as amostras, sugerindo baixos níveis de compostos inorgânicos e de impurezas, estando também de acordo com a Tabela de Composição de Alimentos (IBGE, 1999) onde o limite é de 0-7 %.

Para os lipídios a variação determinada para as amostras analisadas foi de $0,55 \pm 0,03\%$ (amostra A2) a $1,31 \pm 0,03\%$ (amostra A3) (Tabela 2). No estudo desenvolvido por Neta (2012) foram verificados valores entre $1,97 \pm 0,01\%$ a $9,90 \pm 0,07$, em sementes de urucum. De acordo com os autores, essa variação no teor de lipídeos pode se referir às condições climáticas no processo de maturação do urucum. Outros trabalhos também encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo para as sementes de urucum, como em Pereira *et al.* (2009) que encontraram 2,10%, Carvalho *et al.* (2010) quantificaram valores de 1,97 a 3,98% e Demczuc Junior (2012), 1,84%. Sendo os valores que mais se aproximam aos apresentados neste trabalho, segundo a resolução CNNPA no 12/1978, todas amostras estavam dentro do limite de 78%, valor permitido por esta legislação.

Em relação ao teor proteico, as amostras A1, A2 e A3 não apresentaram diferenças significativas, enquanto que a amostra de encapsulado A4 apresentou o maior teor de proteínas (Tabela 2).

O teor de proteína da semente de urucum *in natura* foi de 2,01%, estando abaixo dos valores encontrados por e Taham, Silva e Barrozo (2015) com teor de 11,34% e Moreira (2013) 11,26% para variedade Embrapa 37, 11,25% para a variedade Peruana Paulista e 13,23% para a variedade Focinho de rato. Para encapsulados, o trabalho de Freire (2017) apresenta teores proteicos de 5,86 a 12,07%. Essa discrepância entre os dados obtidos no estudo e os apresentados em literatura, deve-se possivelmente a diferença de metodologias aplicadas, pois em sua maioria os trabalhos realizaram a determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl, enquanto que no presente trabalho foi utilizada a metodologia de Bradford com quantificação espectrofotométrica. Além disso, a variedade de urucum utilizada pode interferir na composição final do produto.

Os teores de bixina apresentaram diferenças significativas entre todas as amostras analisadas, sendo que o maior valor foi encontrado para a amostra *in natura* ($1,14 \pm 0,03\%$). Esse resultado é esperado, uma vez que a amostra *in natura*, não passou pelas etapas de processamento industrial, que pode remover a parte externa das sementes onde se encontra a maior concentração de bixina, e também devido ao tempo de armazenamento.

O trabalho de Barbosa (1998), avaliou quatro variedades de urucum entre elas a casca-verde, casca vermelha, bico de calango e grão preto, com valores de 1,3%, 1,1%, 0,07% e 0,9%, respectivamente, apresentando assim valores próximos aos apresentados no presente estudo. No entanto, esses valores estão abaixo do estipulado para serem considerados materiais de primeira qualidade utilizados para exportação, sendo o teor mínimo de bixina de 2,5% (PEDROSA *et al.*, 1999).

5.2 Potencial antioxidante

As análises antioxidantes visam medir a capacidade da substância impedir a oxidação de substâncias químicas presentes em seres vivos. Os métodos antioxidantes realizados neste trabalho foram os Flavonoides, Fenólicos, Frap e ABTS, sendo que os resultados de cada uma dessas análises são apresentados na Tabela 3.

Para determinação da atividade antioxidante testou-se inicialmente, o método DPPH, porém, nos ensaios com os extratos etanólicos de urucum, a adição do reagente de coloração roxa levou à formação de uma coloração escura do meio de reação, não favorecendo a leitura espectrofotométrica, portanto esta metodologia não pode ser utilizada no presente estudo. O mesmo problema foi enfrentado por Moreira (2014) e por Cardarelli e Mercadante (2006), uma alternativa para esse método seria a realização da atividade antioxidante por cromatografia.

Tabela 3 - Médias (\pm desvio padrão) dos resultados das análises antioxidantes dos extratos etanoicos de sementes de urucum e encapsulados (n=3).

Amostras	Análises antioxidantes			
	Fenólicos (mg EAG/g extrato)	Flavonoides (mg EQ/g extrato)	ABTS (mg EQT/g extrato)	Frap (mg EQT/g extrato)
A1	459,58 \pm 20,83 b	9,77 \pm 0,28 a	2217,33 \pm 32,15 a	3263,33 \pm 171,56 a
A2	50,54 \pm 0,55 d	1,03 \pm 0,03 d	117,33 \pm 23,09 d	736,67 \pm 120,14 d
A3	135,06 \pm 0,73 c	7,72 \pm 0,02 b	925,67 \pm 25,17 c	1790,00 \pm 52,91 c
A4	568,61 \pm 3,81 a	4,43 \pm 0,04 c	1777,33 \pm 45,09 b	2196,67 \pm 83,27 b

EQ- equivalente à quercetina. EAG- equivalente ácido gálico. EQT- equivalente trolox
Fonte: da autora, 2022

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante atuando na neutralização de radicais livres e contribuindo para o controle do estresse oxidativo. De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, os teores de fenólicos totais para a semente de urucum *in natura* foram de 459,58 \pm 20,83 mg EAG/g de extrato. Trabalhos prévios reportaram concentrações de compostos fenólicos que variam de 297,80 a 450,97 mg EAG/g em sementes (LEMOS, 2008), indicando que os valores encontrados no presente trabalho estão próximos ao esperado. Nas amostras encapsuladas houve uma variação significativa entre elas, sendo o maior valor verificado na amostra A4, de 568,61 \pm 3,8 EAG, sendo superior ao valor da amostra *in natura*; e o menor na amostra A3 50,54 \pm 0,55%. Trabalhos prévios quantificaram compostos fenólicos em encapsulados de urucum, obtendo valores entre 22,58 \pm 1,61 a 49,80 \pm 7,51%, sendo, portanto, inferiores aos obtidos no presente estudo (MOREIRA, 2012). De forma geral, os teores de fenólicos apontam a capacidade antioxidante dos vegetais, mostrando assim um elevado grau de pureza da amostra 4.

A análise de flavonoides apresentou concentrações que variaram significativamente entre as amostras, sendo o menor valor obtido para A2 (1,03 \pm 0,03 mg EQ/g extrato) e o maior para a amostra *in natura* (9,77 \pm 0,28 mg EQ/g extrato). Esses valores estão abaixo dos encontrados por Pires (2018) 14,30 a 41,40% para pó de urucum.

Para Guedes (2019) essa variação se deve a presença de compostos dominantes como prunina e naringenina nos extratos de urucum. A naringenina é um flavonoide que ocorre na forma de glicosídeo, apresentando um amplo espectro de

atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica e antioxidante (KOZŁOWSKA,2017).

As concentrações de compostos fenólicos e flavonoides variam de acordo com o solvente utilizado nos processos de extração (CABRAL *et. al.*; 2009). Demczuk *et al.* (2010) e Rios & Marcante (2004) mostram uma maior afinidade com solventes acetona e metanol com extratores, tanto para teores de bixina e compostos bioativos. Além disso, essa variação também pode ocorrer a fatores externos, como a ecologia da flora local, período da coleta, variedade, estágio de maturação da semente, localização e região produtora (FRANCO *et al.*; 2002).

Em relação ao valor de inibição do radical livre ABTS dos extratos etanólicos de urucum, utilizando o antioxidante sintético trolox como controle, foram detectadas diferenças significativas entre as amostras (Tabela 3). A amostra *in natura* (A1) apresentou o maior valor de inibição, sendo de $2217,33 \pm 32,15$ EQT, e a amostra encapsulada A2 o menor valor ($117,33 \pm 23,0$ EQT). Os valores encontrados por Moreira (2017) para encapsulados variaram de $63,62 \pm 0,11$ a $98,41 \pm 0,23\%$, indicando a maior qualidade dos produtos avaliados no presente estudo.

Em relação ao método FRAP, também foram encontradas diferenças significativas entre as amostras (Tabela 3). O método é baseado na capacidade de redução do íon ferrico (Fe^{3+}) para íon Fe^{2+} , presente no complexo 2,4,6 tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie & Strain, 1999)

A amostra *in natura* (A1) foi a que obteve o melhor resultado, de $3263,33 \pm 171,56\%$, sendo superior ao descrito por Guedes (2019), que encontrou valores de $277,70 \pm 3,63\%$.

Tilak *et al.* (2004), apresenta que nos ensaios de FRAP com extratos de extratos do rizoma de urucum processado e cru com os solventes (água/etanol), os valores encontrados tiveram a variação de 0.16 ± 0.02 e 0.85 ± 0.02 de EQT.

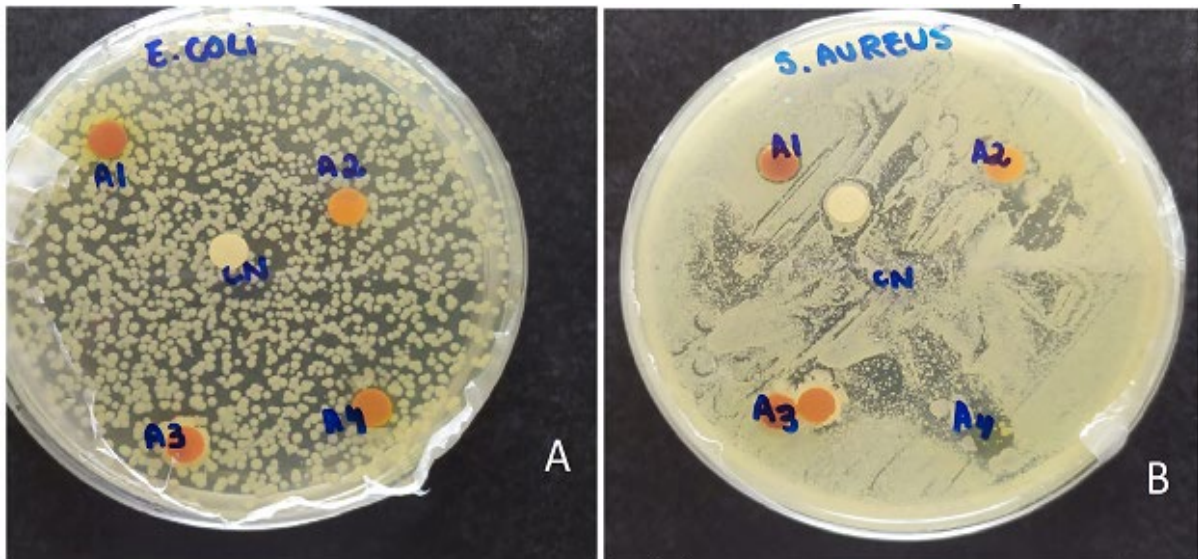
Em relação às amostras encapsuladas foram obtidos valores para a técnica de FRAP para amostras 2, 3 e 4 de $736,67 \pm 120,14\%$ $1790,00 \pm 52,91\%$ e $2196,67 \pm 83,27\%$, respectivamente, sendo superiores aos encontrados na literatura. Carvalho (2021) obteve valores que variaram de $36,21\%$ a $224,28\%$ para encapsulados. No trabalho de Quinteiro-Quiroz *et al.* 2020, verificando a atividade antioxidante pelo método de FRAP para urucum e encapsulados foram obtidos valores que variaram de $8,00$ a $12,56\%$.

Devido aos diferentes métodos de determinação e atuação dos radicais livres nos organismos vivos, não existirá uma forma simples de determinar a atividade antioxidante de forma precisa e quantitativa tornando assim a aplicação de mais de um método necessário para avaliar a atividade antioxidante indicando uma maior precisão do potencial antioxidante da amostra (RODRIGUES, 2013). Os fatores como o método de extração, condições climáticas, origem geográfica e composição química são responsáveis pelos diversos resultados encontrados na literatura quanto à atividade antioxidante dos alimentos e devem ser levados em consideração no momento de comparação dos resultados (ALVES, *et al.* 2010; SANTOS *et al.*, 2013).

5.3 Atividade antimicrobiana

Para as análises antimicrobianas, inicialmente foi realizado o teste de disco difusão como triagem preliminar utilizando duas bactérias uma Gram positiva *S. aureus*. e a outra Gram negativa *E. coli* (Figura 5).

Figura 5: Teste de disco difusão utilizando os extratos de urucum para (A) *E. coli* e (B) *S. aureus*.

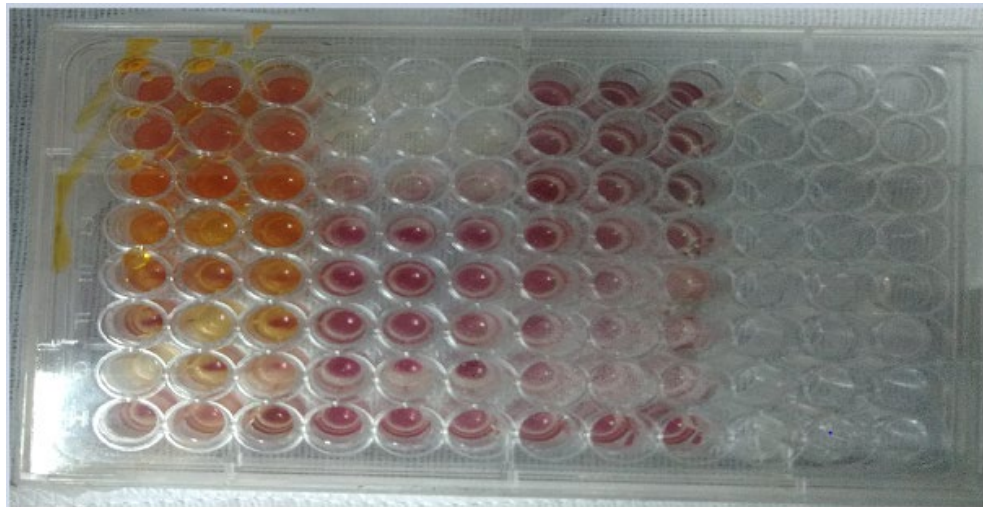


A1- amostra *in natura*, A2- encapsulado de urucum, A3- encapsulado de urucum, A4- encapsulado de urucum e Cn- controle negativo

Fonte: da autora, 2022

Nenhum dos extratos inibiu o crescimento de *E. coli* (Figura 6A), enquanto que para *S. aureus* o extrato da amostra *in natura* apresentou um pequeno halo de inibição (Figura 5B). A partir desse resultado foi realizada a avaliação da CMI para *S. aureus* do extrato das sementes *in natura* (Figura 6).

Figura 6: Placa de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória do extrato de sementes de urucum *in natura* contra *S. aureus*.



Fonte: da autora, 2022

A concentração mínima encontrada para os extratos foi de $37,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para Borges *et al* (2012), substâncias fitoquímicas podem ser consideradas com atividade antimicrobianas quando a CIM estiver entre $100\text{-}1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. E para Morales *et al.* (2008), a inibição do crescimento bacteriano pode ser dividida em quatro grupos, sendo eles, ativa, moderada, fraca e sem atividade, à ativa, quando $\text{CIM} < 100\mu\text{g}/\text{ml}$; moderada, quando CIM se encontra entre $100 - 500\mu\text{g}/\text{ml}$; fraca, quando CIM está entre $500\text{-}1000\mu\text{g}/\text{ml}$; sem atividade, quando $\text{CIM} > 1000\mu\text{g}/\text{ml}$.

Baseado nesse critério, o extrato apresentou uma inibição ativa para *S. aureus*, com o extrato de urucum podendo ser classificado como um agente antibacteriano contra gram-positivas.

Em literatura, foi encontrada atividade antimicrobiana positiva para o extrato de *B. orellana* para *S. aureus* e para *C. sporogenes*, Guedes (2019) atribui esse poder de inibição aos componentes prunina e naringenina. Alguns estudos demonstraram que a naringenina é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular e inibe a motilidade bacteriana, exercendo um efeito antimicrobiano. No entanto, não se verificou atividade antimicrobiana do extrato de *B. orellana* contra *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Foi atribuída a ineficiência de *B. orellana* contra bactérias Gram negativa devido à alta proporção de lipídios que contêm em sua membrana celular externa (Owen e Palombo, 2007). A eficiência da atividade antibacteriana do extrato etanólico

de *B. orellana* foi observada para outros gêneros bacterianos como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* (GÓMEZ *et al.*, 2012).

Muthukumar *et al.* (2014) realizaram um estudo utilizando microesferas de colágeno preparadas a partir do extrato de folhas de *B. orellana* na concentração de 1 mg.mL⁻¹ o qual apresentou propriedades antibacterianas contra *S. aureus* e *E. coli* foram observadas pelo método de difusão em disco. Isso sugere que a atividade antibacteriana depende da concentração do extrato vegetal e também da parte da planta de onde é obtido o extrato. Resultados semelhantes foram obtidos por Tamil *et al.* (2011), que testaram a atividade inibitória de extratos metanólicos de folhas e sementes de *B. orellana* contra cepas bacterianas e fúngica, observando que os extratos foliares foram mais potentes contra os microrganismos testados, e pontuam que diferentes partes da planta possuem compostos bioativos diferentes, acarretando na baixa reprodutibilidade da atividade microbiana do extrato de urucum. A pouca reprodutibilidade é verificada de modo geral no estudo de extratos vegetais, sendo um dos principais obstáculos para seu uso industrial, tendo em vista as variações qualitativas e quantitativas no conteúdo dos compostos bioativos e fitoquímicos resultando em uma eficácia variável (NEGI, 2012).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral, observou-se que todas as amostras apresentaram valores de umidade que favorecem a manutenção da qualidade do produto. O teor de cinzas é elevado na amostra encapsulada A2, indicando a presença de impurezas, que podem afetar a qualidade do produto e reduzir os efeitos benéficos esperados com o seu consumo. Apesar das diferenças estatísticas, o teor de lipídeos e proteínas foi similar nas amostras avaliadas. O teor de bixina, principal composto bioativo das sementes do urucum, é superior na amostra *in natura*, e na amostra A2 verificou-se o menor conteúdo de bixina. Levando em consideração a utilização como um composto nutracêutico, das amostras analisadas no presente trabalho não indica-se o consumo de A2.

As amostras apresentam uma boa capacidade antioxidante, a amostra *in natura* se mostrou superior em quase todas as análises, menos na análise de fenólicos, a qual foi superada pela amostra A4, que nas demais análises foi o encapsulado que melhor se destacou. Para a análise antimicrobiana, os encapsulados não apresentam capacidade de inibir o crescimento das bactérias estudadas, sendo possível visualizar essa capacidade para a amostra *in natura*.

Com os resultados apresentados neste trabalho, foi possível perceber que a utilização dos encapsulados é uma alternativa interessante, que pode trazer benefícios similares ao consumo do produto *in natura*, porém deve-se considerar a composição do produto para escolha pelo consumidor.

8. REFERÊNCIAS

- ALA, F, LS, M. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**. 1997; 43(1):61-8.
- ALVES, C. Q. et al. Metodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substrato organicos. **Quimica Nova**, V. 33, n. 10, p.2202-2210, 2010.
- ANTUNES, E.A..FAMÍLIA DE KITS LABTYPE, 2017
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição, Araraquara** v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.
- BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3
- BARBOSA FILHO, J. A., & GARCIA, E. R. de M. (2010). **Avaliação Da Composição Nutricional De Ovos De Poedeiras Semipesadas De Diferentes Idades Armazenados Em Diferentes Periodos De Estocagem**. ANAIS DO ENIC, 1(2). <https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/1242>
- BARBOSA, K B F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA-FILHO, R. N.; LIRA, B. F. et al. Teores de bixina em quatro variedades de Bixa orellana cultivadas na Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7/8, p. 41-47, 1998
- 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.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; **Quimica de los Alimentos**, Acribia: Zaragoza, 1988.
- BENTO, J AC et al. Avaliação das Metodologias de Prensagem a Frio, Soxhlet e Bligh Dyer, na Extração do Óleo de Pinhão Manso. **Revista Processos Químicos**, v. 11, n. 21, p. 47-50, 2017.
- BENZIE, I., STRAIN, J. **Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration**. Methods in Enzymology, Academic Press 299: 15-27. 1999.
- biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**, v. 28, p. 37-41, 2012
- BORGES, A.; SAAVEDRA, M.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 24 de julho de 1978. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/search?SearchableText=urucum%20legisla%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: 15 de junho de 2022

- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C; PRADO, A.; BEZZERA, R.M.N.B .; ALENCAR, S.m.; IKEGAKI, M., RODALEN P.I, Composição fenólica e atividade antibacteriana e anti oxidantes de própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v,32, n.6, p.1523-1527. São Paulo, 2019
- CÁCERES A, MENENDEZ H, MENDEZ H et al. (1995) **Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases**, J. Ethnopharmacol., 48: 85–8
- CARDARELLI, C. R.; MERCADANTE, A. Z. **Propriedades Antioxidantes e de Cor de Extratos de Urucum**. Congresso Interno de Iniciação Científica. UNICAMP: Campinas, 2006.
- CARDARELLI, C. R.; MERCADANTE, A. Z. **Propriedades Antioxidantes e de Cor de Extratos de Urucum**. Congresso Interno de Iniciação Científica. UNICAMP: Campinas, 2006.
- CARVALHO, B.E.; **Encapsulação de por coacervação complexa de bixina contida nas sementes de urucum (Bixa orellana L.)**. / Brena Eduarda de Carvalho. – Jandaia do Sul, 2021.
- 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 Agrônomo (IAC)**. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 3, p519-524, 2010.
- CASTAÑEDA, R. Biotecnología agropecuaria. Slideshare.net. Disponível em: <<https://es.slideshare.net/raulcc1950/biotecnologa-agropecuaria>>. Acesso em: 4 Aug. 2021.
- CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALESÍ, Í. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. R.; BENCHIMOL, R. L.; MAUÉS, M. M. A cultura do urucum / Embrapa Amazônia Oriental. - 2. edição **revista ampliada**. - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009
- CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.
- CLARK, J. P. Food encapsulation: capturing ane substance by another. **Products & Technologies Processing**, v.56, n.11, p.63-65, nov. 2002.
- COSTA, A. J. C.; GUIMARÃES-DIAS, F.; PÉREZ-MALUF, R. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea). visitantes das flores de urucum em Vitória da Conquista, BA. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 534–537, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/dvJYQK8qY8GhDqHFY7j8tXz/?lang=pt>>. Acesso em: 21 Jul. 2021.
- 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.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.

DEL RÉ, p. v.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, V. 14, n.2, 389-399, 2012

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.

DEMCZUK, J.R.B.; NAKAMURA, A.M; IZIDORO, D.R.; RIBANI, R.H. **Utilização de análise multivariada na caracterização de farelo de urucum**, In: ICBF 2010/ X Encontro Regional Sul de Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Curitiba, Brasil: Anais, 2010

DUNHAM NW AND ALLARD KR (1960) A preliminary pharmacologic investigation of the roots of *Bixa orellana*, **J. Am. Pharm. Assoc.**, 49: 218–19.

FABRI, E. G.; TERAMOTO, J. R. S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 140–140, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362015000100140&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 9 Dec. 2020.

FERNANDES, L. De A. Antioxidantes naturais para aplicação em alimentos. 2019

FERRARI CKB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**. 2004; 5(5): 275-9.

FERREIRA, F S. **Qualidade de coloríficos de urucum comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2011.

FERREIRA, F. S. **Qualidade de Coloríficos de Urucum Comercializados em Diferentes Regiões do Brasil**. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011

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.

FIGUEIREDO, H R; CARVALHO, V R J. **ALIMENTOS FUNCIONAIS: Compostos bioativos e seus efeitos benéficos à saúde**. In: II Congresso Internacional do Grupo Unis. Fundação de Ensino e Pesquisa do Sul de Minas, 2015.

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P. da; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm>. Acesso em: 23/7/2021

FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro - Agronegócio de corantes naturais**. Emepa, SAIA, João Pessoa, 120p., 2002
 FRANCO, C.F.O.; SILVA, F.C.P.; FILHO, J.C.; NETO, M.B.; SÃO JOSÉ, A.R.; FONTINELLI, I. S. C. **Urucuzeiro: Agronegocio de Corantes Naturais**. 1° ed. EMEPA, João Pessoa, PB, P. 120, 2002

FREIRE, S. M. M.; **Qualidade Do Urucum (Bixa Orellana L.) Produzido Pelos agricultores Familiares Do Agreste Paraibano**. João Pessoa, 2017

GIULIANI, E. **ESTIMATIVA DE PREÇO JUSTO PARA SEMENTES DE URUCUM**. Ourucum, 2017. Disponível em: <https://189d048e-2825-4909-a414-c3aad930ace3.filesusr.com/ugd/413a1a_beae354f9c63422ca105bfd4cbf78b0e.pdf>. Acesso em: 29 Jul. 2021.

Gómez, G. C.; Castillo, J. C. Q.; Pérez, J. C. A.; Montoya, J. E. Z. Ethanol extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. **Interciencia** 2012, 37, 547–551.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. 2004; 53(Suppl 1):110-8.

GUEDES, J. C. D. **Caracterização Química E Atividade Biológica De Extratos Etanólicos De Curcuma Longa E Bixa Orellana**. Araçatuba 2019

GUIMA, D S P. Simões Fróes et al. Concentração de proteína solúvel por Bradford revela diferenças no metabolismo de plantas de ora-pro-nobis em diferentes doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, 2013.

GYVES, E.M. **Agrobiotecnologia**. México: Iberoamérica, 1994

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 2004; 142(2): 231-55.

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

IBGE- Dados sobre lavouras permanentes, 1999. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/index.php>. Acesso em: 15 de jun. 2022

KAPOOR, L. RAMAMOORTHY, S. Strategies to meet the global demand for natural food colorant bixin: A multidisciplinary approach. **Journal of Biotechnology**, v. 338, p. 40–51, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165621001929>>. Acesso em: 28 Jul. 2021.

KEHRER, J. P.; SMITH, C. V. Em Natural antioxidants in human health and disease; Frei, B., ed.; **Academic Press: San Diego**, 1992, p. 25.

KHARE cp (2007) **Indian Medicinal Plants**. Springer, New Delhi.

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

KONRADI, E. C. G. TARSITANO, M. A. A.; COSTA, S. M. A. L. **ANÁLISE ECONÔMICA DA CULTURA DO URUCUM (Bixa Orellana). EM ADAMANTINA, SP.** Cultura Agronômica, Ilha Solteira, v.24, n.1, p.93-102, 2015

KOZŁOWSKA, J.; POTANIEC, B.; ZAROWSKA, B.; ANIOŁ, M. **Synthesis and biological activity of novel o-alkyl derivatives of naringenin and their oximes.** *Molecules* 2017, 22, 1–14

LEMOS, 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.

LEMOS, 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.; 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.

LIMA, L.C.F. **Conceitos conjunturais sistematizados da botânica do urucuzeiro.** In: **SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.** A cultura do urucu no Brasil. Vitória da Conquista: UESB, 1990. p.25-28.

LIMA, R. V. **Avaliação das características físicas e biológicas das sementes de urucu c.v. casca verde durante o desenvolvimento da maturação fisiológica.** Universidade Federal do Espírito Santo, julho de 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v.1. 1998. 368p.

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.

MORALES, G. ;PAREDES, A.;SIERRA, P. ;LOYOLA, L. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v.13,p. 790-794, 2008

MOREIRA, P. A. LINS, J. DEQUIGIOVANNI, G.; *et al.* The Domestication of Annatto (Bixa orellana) from Bixa urucurana in Amazonia. **Economic Botany**, v. 69, n. 2, p. 127–135, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-015-9304-0>>. Acesso em: 26 Jul. 2021.

MUTHUKUMAR, T.; SANKARI, D.; TAMIL SELVI, A.; SASTRY, T. P. Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of *Bixa orellana* extract-impregnated collagen microspheres. **Journal of Materials Science** 2014, 49, 5730–5737

NAMIKI, M.; Crit. Rev. **Food Sci. Nutr.** 1990, 29, 273.

NAZARÉ, R. F. R.; KUSUHARA, K.; BARBOSA, W. C. B.; ALVES, S. M.; MARTINSC.S.;RODRIGUÊS, 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.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182-186, 2012.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology** 2012, 156, 7–17

NETA, P. P. L.; **Caracterização da Composição Centesimal e Análises Microbiológicas de Coloríficos de Urucum Comercializados em Diferentes Mercados Públicos da Cidade de Teresina PI.**; 2012

NJIE S, EAM M. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17(2):227-36.

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.

OLIVEIRAS, H. S. H. RIBEIRO, A. G. DA SILVA, D. A.; *et al.* Caracterização e utilização do carotenoide bixina, extrato da semente do urucum (*Bixa Orellana L.*) como agente pigmentante nas dietas de animais não-ruminantes / Characterization and use of the carotenoid bixin, urucum seed extract (*Bixa Orellana L.*) as a pigmenting agent in diets for non-ruminant animals. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 64481–64494, 2021.

OTERO R, NUNEZ V, JIMENEZ SL ET AL. (2000) Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom, **J. Ethnopharmacol.**, 71: 505–11.

OWEN, R. J.; PALOMBO, E. A. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. **Food Control** 2007, 18, 387–390,

PACHECO, S. D. G. **Uso do sal de bixina extraído do urucum (*Bixa orellana L.*) como substituinte do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados.**

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

PEDROSA, J. P. C., EUGÊNEA L. M. R., NETO J. M. de 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.

POLTRONIERI, M. C. BOTELHO, S. M. **Situação atual e potencialidade da cultura do urucum (Bixa orellana L.) na região norte do Brasil.** Embrapa Amazônia Oriental

POLTRONIERI, M. C.; COSTA, M. R. **Modo de polinização controlada para urucunzeiro.** Embrapa Amazônia Oriental. 2002

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químico envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa.** 242 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual De Campinas - Campinas, 2006.

QUINREO-QUIROZ, J. Use of Plant Proteins as Microencapsulating Agents of Bioactive Compounds Extracted from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.) . **Antioxidants** (Basel), V.9, N. 1, p.310, 2020

RAVINDRAN, P.N.; DIVAKARAN, M. ; PILLAI, G.S. Other herbs and spices: achiote to Szechuan pepper. **Handbook of Herbs and Spices**, p. 534–556, 2012.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090409500278>>.

Acesso em: 18 abr. 2022.

REBOUÇAS TNH; SÃO JOSÉ AR. 1996. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização.** Vitória da Conquista-BA: UESB. 42p.

REIS, Ri C et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades melhoradas de mamão. **Ciência Rural**, v. 45, p. 2076-2081, 2015.

RIOS, A. O.; MARCANTE, A. Z. Otimização das condições para a obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em "snacks" extrusados por Clae. **Alimentos e nutrição**. Araraquara, v. 15, n.3, p.203-2213,2004

ROCHA, A. N. POLATTO, L. P. *Bixa orellana* L.(Bixaceae): dependência de polinizadores e estratégias de forrageio dos visitantes florais. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 1-7, 2017.

ROCHA, M. DOMINGUES, R. SILVA, J. R. **VIABILIDADE ECONÔMICA DA CULTURA DO URUCUM: UMA PRIMEIRA ABORDAGEM(I).** IEA - instituto de Economia Agrícola. 1991. Disponível em:

<<http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/publicacoes/asp3-91-1.pdf>>. Acesso em: 11 Dec. 2020.

RODRIGUES, L.M. **Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de Urucum desengorduradas: estudo dos parâmetros de processo**. 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

RODRIGUES, Sueli; SILVA ; EDY. **Exotic fruits reference guide**. Amsterdam: Academic Press, 2018. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/T/A/9780128031384>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

RUSSELL KR, OMORUYI FO AND MORRISON EY (2008) Hypoglycemic activity of Bixa orellana extract in the dog, **Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, 30: 301–5

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

SANTANA, K. C.; GUEDES, P. A.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A. R.; LEMOS, O. L.; VILA, M. T. R.; SOUZA, M. J. L. Teores de bixina em urucum (Bixa orellana). 'Piave vermelha', em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p.19-22, 2008.

SANTOS, F.K.F. **Determinação dos teores de bixina e análise das atividades antimicrobiana dos extratos das sementes de duas variedades de urucum (Bixa Orellana L) em diferentes temperaturas de estocagem**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H. A cultura do urucum no Brasil. Vitória da Conquista BA, UESB, p. 109, 1990.

SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico**. RBME. 2004; 10(10):308-13

SHAHID, M; ZAFAR, M; JAMMU, A; *et al.* Determination of heavy metals from table poultry eggs in Peshawar-Pakistan. ~ 64 ~ **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 3, 2014. Disponível em: <https://www.phytojournal.com/vol3Issue3/Issue_sep_2014/6.11.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2022.

SILVA, F. A.; BIZERRA, A.M.; FERNANDES, P.R.; **TESTES FÍTOQUÍMICOS EM EXTRATOS ORGÂNICOS DE Bixa orellana (URUCUM)**. 2018

SILVA, P. T. da S.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. de; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F. Microencapsulation: Concepts, Mechanisms, Methods and Some Applications in Food Technology. **Ciência rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–11, 2014.

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.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Em Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, T. M.; Rosen, R. T., eds.; Food Phytochemicals for Cancer Prevention: Washington, 1994, p. 20. 17. Frankel, E. N.; Prog. Lip. Res.1980, 19, 1.

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

Tabela 1613: Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 4 ago 2021.

TAHAM, T; SILVA, D DE O; BARROZO, M A S; **Recuperação De Bixina Das Sementes De Urucum (Bixa Orellana L.) Utilizando Uma Nova Configuração Para O Leito De Jorro**. Outubro 2015 vol. 2 num. 1

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

TAMIL SELVI, A.; DINESH, M. G.; SATYAN, R. S.; CHANDRASEKARAN, B.; ROSE, C. Leaf and Seed extracts of Bixa orellana L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science 2011**.

TERASHIMA S; Shimuzu M.; HORIE S; MORITA N (1991) Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. IV. Constituents and aldose reductase inhibitory effect of Chrysanthemum morifolium, Bixa orellana and Ipomoea batatas, **Chem. Pharm. Bull.**, 39(12): 3346–7.

TILAK, J. C.; BANERJEE, M.; MOHAN, H.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant availability of turmeric in relation to its medicinal and culinary uses. **Phytotherapy Research 2004**, 18, 798–804, doi:10.1002/ptr.1553.

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos** / Andressa Veiga – Curitiba, 2016.

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 farmacongosa**. 2007, 35-47

APÊNDICE A - Análises estatísticas realizadas no software R

Análises estatísticas no software R

Para lipideos

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,607455	3	0,202485	317,7	3,27E-05
Within groups:	0,00254916	4	0,000637289		Permutation p (n=99999)
Total:	0,610004	7			0,00974

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	0,100924	Var(error):	0,000637289	ICC:	0,993725
-------------	----------	-------------	-------------	------	----------

omega²: 0,9917

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	6,869E-57
Levene's test, from medians	p (same):	6,869E-57

Welch F test in the case of unequal variances: F=120, df=1,856, p=0,01099

Bayes factor: 564,7 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.						
Significant comparisons are pink.						
Copenhagen-Holland 1988						
€1	€1	€2	€3	€4		
€2	13,08	0,002645	0,0001309	0,1493		
€3	29,5	42,58	3,573E-05	0,0009492		
€4	3,963	17,05	25,53	0,0002039		

PROTEÍNAS

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,505025	3	0,168342	29,66	0,0001101
Within groups:	0,0454	8	0,005675		Permutation p (n=99999)
Total:	0,550425	11			7E-05

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	0,0542222	Var(error):	0,005675	ICC:	0,905254
-------------	-----------	-------------	----------	------	----------

omega²: 0,8775

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,0174
Levene's test, from medians	p (same):	0,2468

Welch F test in the case of unequal variances: F=59,79, df=4,117, p=0,0007578

Bayes factor: 319,1 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.						
Significant comparisons are pink.						
Copenhagen-Holland 1988						
a1	a1	a2	a3	a4		
a2	1,009	0,6783	0,3445	0,0003082		
a3	2,529	4,139	0,0738	0,0001127		
a4	10,63	12,29	8,124	0,001932		

UMIDADE

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	26,2602	3	8,7534	180,9	0,0001002
Within groups:	0,193604	4	0,0484009		Permutation p (n=99999)
Total:	26,4538	7			0,02465

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	4,3525	Var(error):	0,0484009	ICC:	0,989002
-------------	--------	-------------	-----------	------	----------

omega²: 0,9854

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	5,52E-59
Levene's test, from medians	p (same):	5,52E-59

Welch F test in the case of unequal variances: F=917,6, df=1,679, p=0,002864

Bayes factor: 245,8 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's p
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.						
Significant comparisons are pink.						
	a1	a2	a3	a4	Copenhaver-Holland 1988	
a1		0,02285	0,0001794	0,0001886		
a2	7,275		0,0005838	0,0006357		
a3	26,56	19,28		0,9901		
a4	26,15	18,87	0,4117			

CINZAS

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	484,967	3	161,656	4,66E04	1,535E-09
Within groups:	0,0138748	4	0,00346869		Permutation p (n=99999)
Total:	484,98	7			0,0077

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	80,826	Var(error):	0,00346869	ICC:	0,999957
-------------	--------	-------------	------------	------	----------

omega²: 0,9999

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	8,26E-56
Levene's test, from medians	p (same):	8,26E-56

Welch F test in the case of unequal variances: F=1,537E04, df=2,103, p=4,14E-05

Bayes factor: 8,709E05 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.					
Significant comparisons are pink.					
	a1	a2	a3	a4	Copenhaver-H
a1		9,237E-14	0,0011111	1,269E-07	
a2	403,9		9,237E-14	9,237E-14	
a3	16,37	387,5		8,26E-09	
a4	76,82	480,7	93,2		

BIXINA

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,34594	3	0,448648	1,329E04	1,886E-08
Within groups:	0,000135	4	3,375E-05		Permutation p (n=99999)
Total:	1,34608	7			0,0072

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	0,224307	Var(error):	3,375E-05	ICC:	0,99985
-------------	----------	-------------	-----------	------	---------

omega²: 0,9998

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	4,477E-55
Levene's test, from medians	p (same):	4,477E-55

Welch F test in the case of unequal variances: F=1,889E05, df=1,877, p=1,061E-05

Bayes factor: 1,476E05 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.					Copenhaver-H
	a1	a2	a3	a4	
a1		9,237E-14	9,237E-14	9,237E-14	
a2	267,9		4,146E-08	1,997E-06	
a3	186	81,91		0,0005756	
a4	205,3	62,56	19,35		

FLAVONÓIDES

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	108,082	3	36,0272	1567	2,948E-10
Within groups:	0,160917	7	0,0229881		Permutation p (n=99999)
Total:	108,243	10			5E-05

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	13,2016	Var(error):	0,0229881	ICC:	0,998262
-------------	---------	-------------	-----------	------	----------

omega²: 0,9977

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,04781
Levene's test, from medians	p (same):	0,1855

Welch F test in the case of unequal variances: F=1,599E04, df=2,959, p=9,997E-07

Bayes factor: 1,377E07 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.					Copenhaver-H
	a1	a2	a3	a4	
a1		0	3,157E-06	0	
a2	89,31		0	1,935E-07	
a3	23,37	68,41		1,317E-07	
a4	61,03	34,72	37,66		

FENÓLICOS

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	561022	3	187007	1681	1,548E-11
Within groups:	889,988	8	111,249		Permutation p (n=99999)
Total:	561912	11			8E-05

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	62298,7	Var(error):	111,249	ICC:	0,998217
ω^2 :	0,9976				

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,07334
Levene's test, from medians	p (same):	0,07386

Welch F test in the case of unequal variances: $F=2,384E04$, $df=3,972$, $p=6,627E-09$

Bayes factor: 2,783E08 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dun
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.						
Significant comparisons are pink.						
	a1	a2	a3	a4	Copenhaver-Holland	
a1		2,583E-10	2,613E-09	6,726E-06		
a2	67,17		4,548E-05	5,981E-12		
a3	53,29	13,88		1,193E-10		
a4	17,9	85,07	71,2			

FRAP

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	9,82427E06	3	3,27476E06	244,4	3,326E-08
Within groups:	107200	8	13400		Permutation p (n=99999)
Total:	9,93147E06	11			0,0001

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	1,08712E06	Var(error):	13400	ICC:	0,987824
ω^2 :	0,9838				

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,39
Levene's test, from medians	p (same):	0,5957

Welch F test in the case of unequal variances: $F=130,3$, $df=4,129$, $p=0,000154$

Bayes factor: 3,431E05 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dun
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.						
Significant comparisons are pink.						
	a1	a2	a3	a4	Copenhaver-Holland	
a1		1,891E-08	1,384E-06	1,601E-05		
a2	37,81		1,76E-05	1,486E-06		
a3	22,04	15,76		0,01116		
a4	15,96	21,85	6,085			

ABTS

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	7,80476E06	3	2,60159E06	2458	3,392E-12
Within groups:	8466,67	8	1058,33		Permutation p (n=99999)
Total:	7,81322E06	11			7E-05

Components of variance (only for random effects):

Var(group):	866842	Var(error):	1058,33	ICC:	0,998781
-------------	--------	-------------	---------	------	----------

ω^2 : 0,9984

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,6792
Levene's test, from medians	p (same):	0,8335

Welch F test in the case of unequal variances: $F=2443$, $df=4,352$, $p=1,84E-07$

Bayes factor: 1,049E09 (decisive evidence for unequal means)

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.					Copenhaver
	a1	a2	a3	a4	
a1		5,584E-14	1,91E-10	8,531E-07	
a2	111,8		1,011E-08	2,741E-12	
a3	68,77	43,04		7,644E-09	
a4	23,43	88,38	45,34		